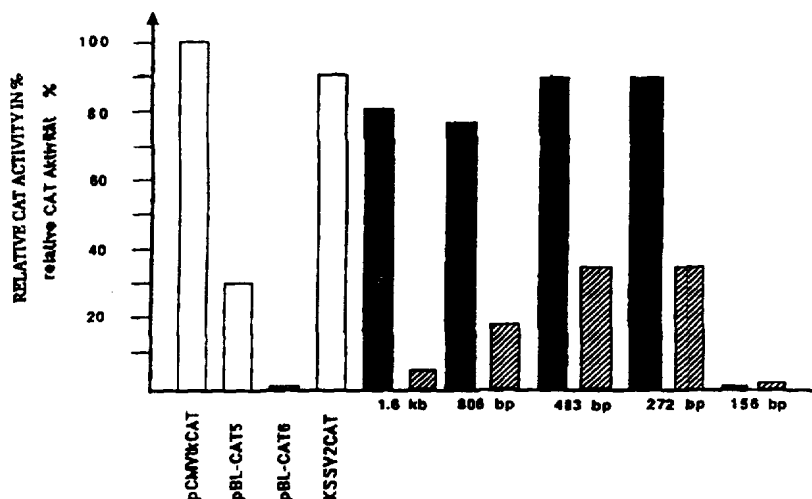


PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/85, C07K 14/47, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/15664 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Mai 1997 (01.05.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04631 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Oktober 1996 (24.10.96) (30) Prioritätsdaten: 195 39 493.3 24. Oktober 1995 (24.10.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DR. KARL THOMAE GMBH [DE/DE]; D-88397 Biberach (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ENENKEL, Barbara [DE/DE]; Martin-Luther-Strasse 7, D-88447 Warthausen (DE). GANNON, Frank [IE/DE]; Zähringerstrasse 19, D-69115 Heidelberg (DE). BERGEMANN, Klaus [DE/DE]; Hugo-Häring-Strasse 49, D-88400 Biberach (DE). NOE, Wolfgang [DE/DE]; Köhlesrain 87/1, D-88400 Biberach (DE). (74) Anwälte: LAUDIEN, Dieter usw.; Boehringer Ingelheim GmbH, A Patente, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: INTENSIVE HOMOLOGOUS PROMOTER OBTAINED FROM HAMSTERS**(54) Bezeichnung:** STARKER HOMOLOGER PROMOTOR AUS HAMSTER**(57) Abstract**

The invention concerns an intensive homologous promoter obtained from hamsters, in particular the promoter of the gene which codes for ubiquitin-S27a fusion protein. The promoter can be used in processes for preparing heterologous gene products in culture cells, in particular in Chinese hamster ovary cells.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen starken homologen Promotor aus Hamster. Insbesondere handelt es sich dabei um den Promotor des Gens, das für das Ubiquitin-S27a-Fusionsprotein kodiert. Der Promotor kann für Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte in Kulturzellen verwendet werden, insbesondere in CHO-Zellen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Starker homologer Promotor aus Hamster

Die Erfindung betrifft einen starken homologen Promotor aus Hamster, Nukleinsäuren, die Promotor- und/oder regulatorische Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens enthalten, sowie Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte unter Verwendung solcher Nukleinsäuren.

Bei der wirtschaftlich bedeutenden Herstellung von Proteinen durch Expression rekombinanter Gene in eukaryontischen Wirtszellen, beispielsweise CHO-Zellen, werden bisher heterologe Expressionssysteme verwendet, d.h. daß zum Beispiel die Promotor/Enhancer- sowie Terminationselemente viralen Ursprungs sind. Die Verwendung von nichtviralen Promotoren an Stelle von viralen Sequenzen in Expressionssystemen wäre im Hinblick auf die Einstellung der Öffentlichkeit bezüglich Gen- und Biotechnologie von Vorteil und würde außerdem zur Biosicherheit der Vektorsysteme, die für die Expression von Genen in tierischen Zellkulturen verwendet werden, beitragen.

Beim Ubiquitin handelt es sich um ein hoch konserviertes Polypeptid von 76 Aminosäuren, das in allen eukaryontischen Zellen in großer Zahl zu finden ist und durch eine diverse Genfamilie kodiert wird (Reviews: Jentsch et al., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Ubiquitin spielt durch die Modifizierung von Targetproteinen eine bedeutende Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie z.B. der ATP-abhängigen Proteindegradation über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg (Ciechanover, 1994). Auf Grund ihrer Struktur kann man die Ubiquitingene in zwei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe sind die Polyubiquitingene zusammengefaßt, in denen 228 bp große Ubiquitin-Kodiereinheiten (= 76 Aminosäuren) in Kopf-zu-Schwanzanordnung aneinandergereiht sind (Jentsch et al., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Die Anzahl der Einheiten variiert von Spezies zu Spezies, wobei man in den meisten Organismen zwei Polyubiquitingene unterschiedlicher Länge findet (Fornace et al., 1989; Wiborg et al., 1985). Die Promotorregionen dieser Gene enthalten eine TATA-Box und Promotor/Enhancer-Elemente für einen Hitzeschockinduktor (Schlesinger & Bond, 1987).

Die Ubiquitininfusionsgene werden der zweiten Gruppe zugeordnet. Es handelt sich dabei um Fusionen zwischen einer Ubiquitineinheit und einem ribosomalen Protein (Jentsch et al., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Die beiden bekannten Ubiquitininfusionsgene können auf Grund der Unterschiede in der Länge und Sequenz des ribosomalen Proteins identifiziert werden. In dem einen Fall handelt es sich um ein ribosomales Protein der großen Ribosomenuntereinheit mit einer Länge von 52 Aminosäuren (Baker et al., 1991) und in dem anderen Fall um ein ribosomales Protein der kleinen Ribosomenuntereinheit (in Säugern als

Protein S27a bezeichnet) mit einer spezieabhängigen Länge von 76 bis 81 Aminosäuren (Redman & Rechsteiner, 1989). Der Ubiquitinanteil in diesen Fusionsproteinen unterstützt dabei anscheinend die effiziente Integration der ribosomalen Proteine in das Ribosom (Finley et al., 1989).

5

Die individuellen Ubiquitingene werden in den verschiedensten Geweben eines Organismus und in verschiedenen Entwicklungsstadien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. So werden die Polyubiquitingene konstitutiv in geringem Level, der lediglich unter Streß-
einwirkung stark erhöht wird, exprimiert (Fornace et al., 1989; Schlesinger & Bond, 1987).

10 Die Ubiquitininfusionsgene werden vor allem verstärkt in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. In terminal differenzierten und wachstumsarretierten Zellen ist die Expression hingegen herunterreguliert (Schlesinger & Bond, 1987; Shimbara et al., 1993; Wong et al., 1993).

15 Die Aufgabe, deren Lösung der Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, war die Bereitstellung starker nichtviraler Promotoren für Verfahren zur Herstellung heterologer Genprodukte in Kulturzellen, insbesondere Hamsterzellen.

Überraschend wurde ein Promotor eines Gens aufgefunden, der insbesondere in
20 CHO-Zellen eine dem viralen SV40-Promotor gleichwertige Aktivität hat. Dieses Gen kodiert für das Ubiquitininfusionsprotein Ub/S27a. Der Ub/S27a-Promotor ist Gegenstand der Erfindung, insbesondere der Ub/S27a-Promotor aus Hamster. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Regulatorsequenzen in der 5' untranslatierten Region des Ub/S27a-Gens.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäuremolekül, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen des Ub/S27a-Gens enthält. Bevorzugt sind dabei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen aus dem Ub/27a-Gen des Hamsters abgeleitet. Insbesondere ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül Gegenstand der Erfindung, das Promotorsequenzen und/oder andere regula-
30 torische Sequenzen enthält, die in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuremoleküle, die Sequenzen aus dem Bereich enthalten, der den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht. Es liegt im Können des Fachmanns, mit den Methoden, die in Beispiel 4 beschrieben werden,
35 Nukleinsäuremoleküle herzustellen, die Teilsequenzen der erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, insbesondere eine Teilsequenz des Bereichs von -161 bis -45, die ebenfalls starke Promotoraktivität vermitteln können. Solche Teilsequenzen sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Es liegt auch im Können des Fachmanns, die Promotorsequenz durch Substitution, Insertion, Deletion oder Addition von einer, zwei, drei oder mehr Basen gegenüber der Sequenz gemäß Abb. 5 zu verändern, ohne dadurch die Promotoraktivität, die mit der in Beispiel 4 beschriebenen Methode gemessen werden kann, deutlich zu erniedrigen. Unter einer deutlichen Erniedrigung der Promotoraktivität soll eine Erniedrigung um mehr als 50% des Wertes, der für das 272 bp-Deletionsfragment aus Tabelle 1 im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 unter vergleichbaren Bedingungen erhalten wird, verstanden werden. Solche Varianten der Promotorsequenz sind daher ausdrücklich in die Erfindung eingeschlossen.

In den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen sind die Promotor- und/oder regulatorischen Sequenzen vorteilhaft mit einem Gen funktionell verknüpft, sodaß dieses Gen unter der Kontrolle dieser Sequenzen exprimiert werden kann. Ein solches Gen kann beispielsweise für Gewebefibrinogenaktivator (EP 0093619), ein *second-generation*-Plasminogenaktivator, z.B. tkn-t-PA (WO 93/24635), Interferon, z.B. Interferon- α (EP 0595241), Interferon- β (EP 0041313, EP 0287075), Interferon- γ (EP 0146354) oder Interferon- ω (EP 0170204), Tumornekrosefaktor (EP 0168214), Erythropoietin (WO 86/03520), Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (EP 0220520, EP 0237545) oder Mangan-Superoxiddismutase (EP 0282899) kodieren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Es kann sich auch um ein Gen handeln, das für eine Immunglobulinkette, die variable Domäne einer Immunglobulinkette, einen humanisierten Antikörper (EP 0230400, EP 0451216), einen single-chain-Antikörper etc. kodiert. Insbesondere kann ein solches Gen für eine humanisierte Immunglobulinkette kodieren, die für variantes CD44 spezifisch ist (WO 95/33771). Zweckmäßig kann ein solches Nukleinsäuremolekül ein Expressionsvektor sein (Sambrook *et al.*, 16.3-16.29, 1989). Gegenstand der Erfindung sind besonders auch solche Expressionsvektoren, die nach der Einführung in eine eukaryontische Wirtszelle durch Rekombination in deren Genom integriert werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, in die eines der genannten Nukleinsäuremoleküle eingeführt wurde. Bevorzugt ist in eine solche Wirtszelle ein Expressionsvektor eingeführt, der das Gen für ein heterologes Genprodukt in Verknüpfung mit dem Promotor des Ub/S27a-Gens und/oder weiteren regulatorischen Sequenzen enthält. Die erfindungsgemäße Wirtszelle ist bevorzugt eine Säugerzelle. Insbesondere kann die Wirtszelle eine Hamsterzelle, z.B. eine CHO- (CHO = Chinese hamster ovary; Urlaub *et* Chasin, 1980; vgl. auch Kaufman, 1987 sowie Referenzen darin, sowie Sambrook *et al.*, 16.28-16.29, 1989) BHK- (BHK = Baby hamster kidney) oder Hybridomzelle, besonders bevorzugt eine CHO-Zelle sein.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß eines der erwähnten Nukleinsäuremoleküle in die eukaryontische Wirtszelle eingeführt wird, die Wirtszelle kultiviert und das synthetisierte Genprodukt isoliert wird. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das heterologe Genprodukt unter der Kontrolle von Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen des Ub/S27a-Gens, vorzugsweise aus Hamster, exprimiert. Vorteilhaft können für ein solches Verfahren Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die Promotorsequenzen und/oder regulatorische Sequenzen enthalten, die in der Abb. 5 enthalten sind. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht. Auch hier liegt es im Können des Fachmanns, Teilsequenzen mit Promotoraktivität oder gleichwertige Varianten der offenbarten Sequenzen herzustellen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein starker homologer Promotor des Hamsters. Ein solcher Promotor, der für die Herstellung heterologer Genprodukte in Hamsterzellen, insbesondere CHO-Zellen sehr vorteilhaft ist, wird hiermit erstmalig bereitgestellt. Insbesondere betrifft die Erfindung einen starken homologen Promotor des Hamsters, der in CHO-Zellen im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 eine größere Aktivität aufweist als der Thymidinkinasepromotor aus *Herpes simplex*. Vorteilhaft weist ein solcher Promotor eine Transkriptionsaktivität auf, die mindestens in der gleichen Größenordnung liegt wie diejenige des SV40-Promotors. In der gleichen Größenordnung soll hier bedeuten, daß der erfindungsgemäße Promotor mindestens 50%, besser mindestens 80%, noch mehr bevorzugt mindestens 90% der Aktivität des SV40-Promotors im CAT-Assay gemäß Beispiel 4 hat. Bevorzugt ist ein solcher Promotor dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eines der Merkmale: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Besonders bevorzugt ist ein solcher Promotor, der eine Sp1-Bindungsstelle bei Abwesenheit einer TATA-Box aufweist. Ferner ist ein solcher Promotor bevorzugt, der konstitutiv aktiviert ist und insbesondere unter serumhaltigen, serumarmen und serumfreien Zellkulturbedingungen gleichermaßen aktiv ist. In einer anderen Ausführungsform handelt es sich um einen induzierbaren Promotor, insbesondere um einen Promotor, der durch Serumentzug aktiviert wird. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform ist ein Promotor mit einer Sequenz, die in Abb. 5 enthalten ist. Besonders bevorzugt ist dabei eine Sequenz, die in der Sequenz enthalten ist, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Expression eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, das dadurch

gekennzeichnet ist, daß das Genprodukt unter der Kontrolle eines starken homologen Promotors des Hamsters exprimiert wird. In bevorzugten Ausführungsformen ist ein solcher Promotor durch Merkmale gekennzeichnet, wie sie im vorigen Absatz beschrieben wurden.

5 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Promotors, wie er vorstehend beschrieben wurde, zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO- oder BHK-Zellen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Ub/S27a-Gen aus Hamster.
10 Vorzugsweise hat ein solches Gen eine Sequenz gemäß Abb. 1 oder eine Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einem Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz gemäß Abb. 1 hybridisiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein solches Gen Promotor- und/oder regulatorische Sequenzen, wie sie in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

15 Die beschriebenen Promotorsequenzen können in einer Expressionskassette in funktionellen Zusammenhang mit weiteren regulatorischen Sequenzen gebracht werden. Beispielsweise können sie mit Enhancer-Sequenzen funktionell verknüpft und so die Transkriptionsaktivität gesteigert werden. Dabei kann es sich um einen oder mehrere Enhancer
20 und/oder mehrere Kopien einer Enhancer-Sequenz handeln. Beispielsweise kann dabei ein CMV- oder ein SV40-Enhancer verwendet werden. Der humane CMV-Enhancer gehört dabei zu den stärksten bisher identifizierten Enhancern. Ein Beispiel für einen induzierbaren Enhancer ist der Metallothionein-Enhancer, der durch Glukokortikoide oder Schwermetalle stimuliert werden kann. Eine weitere mögliche Modifikation wäre z.B. die Einführung multipler Sp1-Bindungsstellen. Die Promotorsequenzen können ferner mit regulatorischen Sequenzen kombiniert werden, die eine Steuerung/Regulierung der Transkriptionsaktivität gestatten. So kann der Promotor reprimierbar/induzierbar gemacht werden. Dies kann beispielsweise durch die Verknüpfung mit Sequenzen geschehen, die Bindungsstellen für positiv oder negativ regulierende Transkriptionsfaktoren darstellen. Der oben genannte Transkriptionsfaktor SP-1 beispielsweise hat einen positiven Einfluß auf die Transkriptionsaktivität. Ein weiteres Beispiel ist die Bindungsstelle für das Aktivatorprotein AP-1, das sowohl in positiver als auch in negativer Weise auf die Transkription einwirken kann. Die Aktivität des AP-1 kann durch verschiedenste Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Serum, gesteuert werden (Faisst *et* Meyer, 1992, und Referenzen darin). Die Transkriptionseffizienz kann auch dadurch gesteigert werden, daß die Promotorsequenz durch
30 Mutation (Substitution, Insertion, Deletion) von einer, zwei, drei oder mehr Basen verändert wird und dann im CAT-Test gemäß Beispiel 4 gemessen wird, ob sich dadurch die Promotoraktivität erhöht. Durch die in diesem Absatz beschriebenen Maßnahmen kann eine

optimierte Expressionskassette erhalten werden, die von hohem Nutzen für die Expression heterologer Genprodukte, insbesondere in CHO-Zellen, ist. Eine durch eine oder mehrere solcher Maßnahmen erhaltene Expressionskassette ist daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

5

In DNaseI-Footprint- und Mutationsanalysen kann untersucht werden, welche Faktoren die Expression beeinflussen und ob die Promotoraktivität durch die Deletierung von möglicherweise vorhandenen negativen Kontrollelementen und durch die Einführung von weiteren positiven Kontrollelementen noch gesteigert werden kann. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben außerdem gezeigt, daß die Expression des Ub/S27a-Genes ganz offensichtlich durch verschiedene Faktoren reguliert werden kann. So zeigte die Gruppe um Shimbara, daß bei einer terminalen *in vitro* Differenzierung von humanen Leukämie-Zelllinien (HL-60, K562, U937, THO1) durch Zugabe von verschiedenen Substanzen wie TPA (12-O-Tetra-decanoylphosphol-13-acetat), DMSO, Retinsäure und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in das Kulturmedium die Expression des Ub/S27a-Genes herunterreguliert wird (Shimbara et al., 1993). Und die Gruppe um Wong stellte eine Überexpression des Ub/S27a-Gens in Carcinomazellen des Enddarms fest (Wong et al., 1993). Die Genexpression korrelierte dabei mit den klinischen Tumorstadien mit einer höheren Expression in weiter fortgeschrittenem Krebs.

20

Die Ausführung der Erfindung ist dem Fachmann in Kenntnis des Offenbarungsgehaltes dieser Anmeldung mit an sich bekannten Methoden sowie gemäß der Beispiele möglich.

Das komplette Ub/S27a-Gen, die 5'-untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens bzw. ausgewählte Fragmente davon können in Kenntnis der Sequenzen gemäß Abb. 1, 2 und 5 mit verschiedenen Standardmethoden erhalten werden. Aus der Sequenz gemäß Abb. 5 kann beispielsweise ein geeigneter Abschnitt ausgewählt und eine Oligonukleotid-Sonde chemisch synthetisiert werden, die die Sequenz dieses Abschnitts hat (Sambrook et al., 11.3-11.44, 1989). Mit einer solchen Sonde kann durch Hybridisierung aus einer genomischen Bibliothek (Sambrook et al., 9.4-9.62, 11.45-11.61, 1989) des Hamsters das Ub/S27a-Gen bzw. dessen 5'-untranslatierte Region kloniert werden. Die 5'-untranslatierte Region bzw. spezielle Fragmente davon können auch leicht durch PCR-Amplifikation mit entsprechenden Primern aus einer genomischen Bibliothek erhalten werden (Sambrook et al., 14.5-14.35, 1989). Diese Methode eignet sich besonders zur Herstellung ausgewählter Fragmente der Promotorregion, etwa des Bereichs von -161 bis -45 oder eines Abschnitts dieses Bereiches. Fragmente der 5'-untranslatierten Region wie etwa die in Tabelle 1 aufgeführten können auch durch limitierten Exonuklease III-Verdau aus größeren DNA-Fragmenten erhalten werden (Sambrook et al., 15.14-15.19; 5.84-5.85, 1989). Solche DNA-

35

Moleküle können auch chemisch synthetisiert oder aus chemisch synthetisierten Fragmenten durch Ligation erzeugt werden. Das Ub/S27a-Gen einer anderen Species, vorzugsweise Säugerspecies, bzw. dessen 5'-untranslatierte Region kann durch Kreuzhybridisierung mit Sonden aus dem 5'-untranslatierten Bereich des Hamster-Ub/S27a-Gens oder etwa Sonden aus dem S27a-Anteil des Hamster-Ub/S27a-Gens isoliert werden.

Es steht im Stand der Technik eine Anzahl von Expressionsvektoren zur Verfügung, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Promotor- und/oder regulatorischen Sequenzen können an Stelle der in diesen Vektoren vorhandenen Promotorelemente integriert werden und so die Expression des jeweiligen Gens steuern, das mit diesem Vektor exprimiert werden soll. Kommerziell erhältliche Vektoren, die sich zur Integration des erfindungsgemäßen Promotors gut eignen, sind beispielsweise der pCAT-Basic Vector (Promega; kompilierte Sequenz zugänglich über EMBL Accession No. X65322) oder der pCAT-Enhancer Vector, der zusätzlich noch einen SV40-Enhancer enthält (Promega; kompilierte Sequenz zugänglich über EMBL Accession No. X65319). Ein Beispiel für einen promotorlosen Vektor ist das Plasmid pBL-CAT6 (Boshart *et al.*, 1992; siehe auch Luckow *et al.*, 1987). Die erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können in die HindIII-, SphI-, PstI-, SalI-, XbaI-, BamHI-, BglII- oder XhoI-Restriktionsschnittstellen dieses Vektors ligiert werden und so mit dem in diesem Vektor enthaltenen Chloramphenicol-Transferase (CAT)-Gen funktionell verknüpft werden. Anstelle des CAT-Gens kann auch ein anderes Gen, etwa für Gewebsplasminogenaktivator, in diesen Vektor integriert werden. Das CAT-Gen kann z.B. durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und ClaI aus dem Vektor pBL-CAT6 entfernt werden. Die dabei deletierte SV40 3' untranslatierte Region, die die Intronsequenz und das Polyadenylierungssignal enthält, kann ggf. (d.h. sofern deren Funktion nicht durch die geneigenen 3'-Sequenzen übernommen wird) nachfolgend wieder eingebaut werden, indem man z.B. diese SV40-Region mittels PCR amplifiziert und dabei gleich mit geeigneten Restriktionsschnittstellen an beiden Enden versieht, damit nachfolgende Umklonierungen, z.B. bei Einführung eines anderen gewünschten Genes, erleichtert werden. Eine andere Strategie der Auswechslung des CAT-Genes gegen ein anderes Gen ist, daß man zunächst mittels PCR und geeigneter mutagener Oligonukleotide eine singuläre Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende der SV40-Region in den Vektor pBL-CAT6 einführt, die es nachfolgend ermöglicht, gezielt das CAT-Gen zu entfernen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung des Vektors pLUC, der im Prinzip wie pBL-CAT6 aufgebaut ist, aber anstelle des CAT-Gens ein Luciferase-Reportergen enthält. Dieses läßt sich leicht durch einen XhoI/EcoNI-Doppelverdau entfernen, wobei die SV40-Sequenz im Vektor verbleibt.

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien mit hoher Expression des heterologen Gens wählt man vorteilhaft einen Vektor, der die Selektion von Transformanten gestattet, die den Vektor in ihr Chromosom integriert und das integrierte heterologe Gen amplifiziert haben. Vektoren für solche Selektions-/Amplifikationsverfahren wie das DHFR/Methotrexat-Verfahren in DHFR-defizienten Zelllinien (z.B. CHO-DUKX) sind ebenfalls Stand der Technik (Sambrook *et al.*, 16.9-16.15; 16.28-16.29, 1989).

Verfahren zur Einbringung der erhaltenen Vektoren in Wirtszellen ebenso wie die Selektion und Kultur der Transformanten kann der Fachmann Standardwerken entnehmen (z.B. Sambrook *et al.*, 16.3-16.81, 1989).

Abgesehen von der Optimierung des Promotors bietet sich noch ein ganz anderer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Produktausbeute, und zwar über einen Gendosiseffekt. Mit steigender Kopienzahl der ins Genom integrierten Vektorkonstrukte sollte auch die Menge an produzierten Transkripten zunehmen. Eine spontane Amplifikation der eingeführten Konstrukte, die in einer stabilen Integration einer Vielzahl von Kopien resultiert, kann durch die Verwendung einer Sequenz mit amplifikationsfördernden Eigenschaften, sogenannten "amplification promoting sequences", erzielt werden. Eine solche Sequenz, die einen sehr hohen AT-Gehalt besitzt, war z.B. aus der nicht-transkribierten Intergenregion der ribosomalen Mausgene isoliert worden (Wegner *et al.*, 1989) und wurde bereits erfolgreich zur stabilen und effizienten Inhibierung der HIV-1 Replikation durch antisense RNA eingesetzt (Meyer *et al.*, 1993). Ein 49 bp großer Sequenzbereich der Ub/S27a 5' untranslatierten Region (Position - 1477 bis - 1429; Abb.4) mit einem hohen AT-Gehalt von 88% weist große Homologie zu den oben beschriebenen amplifikationsfördernden Sequenzen der Maus auf. Daß dieser CHO-Sequenzbereich ebenfalls solche Eigenschaften besitzt, kann durch den Einsatz von Ub/S27a-Promotorkonstrukten, denen diese CHO-Sequenz vorgeschaltet ist, überprüft werden.

Beschreibung der Abbildungen

Abb.1: Vergleich der DNA-Sequenz des kompletten Ubiquitin/S27a cDNA-Klons aus CHO-Zellen mit der humanen cDNA-Sequenz. Vergleich der CHO Ub/S27a cDNA-Sequenz mit der humanen cDNA-Sequenz (Adams *et al.*, 1992). Identitäten innerhalb der Sequenz sind durch "*" hervorgehoben. Der Ubiquitinanteil ist durch Doppellinien über der Sequenz gekennzeichnet. Die Positionen der drei Introns sind durch Dreiecke markiert.

_____ Poly A Signal :::: Startkodon +++ Stoppkodon

5 **Abb.2: Aminosäuresequenz des Ubiquitininfusionsproteins Ub/S27a.** Vergleich der aus der CHO cDNA -Sequenz abgeleiteten Ub/S27a-Aminosäuresequenz mit der humanen Aminosäuresequenz (Adams et al., 1992). Identitäten innerhalb der Sequenzen sind durch "*" gekennzeichnet. Die Ubiquitineinheit von 76 Aminosäuren ist durch Doppellinien über der Sequenz hervorgehoben.

10 **Abb.3: Analyse der Ub/S27a-Transkriptlevel in CHO-Zellen.** Die denaturierte zytoplasmatische Gesamt-RNA (10 µg) von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen wurde in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Hybridisierungsprobe wurde die ³²P-markierte Ub/S27a-cDNA (508 bp) aus CHO eingesetzt. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug 3 Stunden.

1 + 3 serumkultivierte CHO-Zellen

20 2 + 4 serumfrei kultivierte CHO-Zellen

5 serumkultivierte CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert

6 serumfrei kultivierte CHO-Zellen wurden für 24 Stunden in serumhaltigem Medium kultiviert

25 **Abb. 4: Strategie zur Sequenzierung der Ub/S27a 5' untranslatierten Region.** Die 2.5 kb große 5' untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens ist schematisch dargestellt. Es wurden sowohl subklonierte Restriktionsfragmente als auch durch Exonuklease III-Verdau erzeugte Deletionsklone sequenziert, wobei Ausmaß und Richtung der Sequenzierungen durch Pfeile angezeigt sind.

30 **Abb. 5: Genomische DNA-Sequenz der Ub/S27a 5' untranslatierten Region.**

35 Zeichenerklärung:

_____ Restriktionsschnittstellen
| -> 5' Ende der Promotordeletionsklone

* 3' Ende der Promotordeletionsklone
 ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ Homologie zu amplifikationsfördernden Sequenzen
 " " " " " " polypyrimidinreicher Sequenzbereich
 ::: Startkodon
 5 + 1, + 13 durch S1 Nukleasekartierung bestimmte Transkriptionsstartstellen
 + 85 über Primer-Extension erhaltenes 5' Ende
 > > > > > Sp1-Bindungsstelle

Die Nukleotide sind in Relation zur Transkriptionsstartstelle, die mit +1 bezeichnet
 10 ist, numeriert. Die Restriktionsschnittstellen für SacII und EagI, die für GC-reiche Sequenzbereiche spezifisch sind, sowie die zu Subklonierungszwecken herangezogenen Restriktionsschnittstellen für EcoRI, HincII und HindIII sind in der Sequenz durch Unterstreichung hervorgehoben. Zur Kennzeichnung der Intronsequenz wurden Kleinbuchstaben verwendet. Die Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz wiedergegeben.

15

Abb.6: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch Primer-Extension. Die Primer-Extensionsanalyse wurde mit 5 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA von serumkultivierten CHO-Zellen durchgeführt (Bahn 1). Als Kontrolle wurde 5 µg Hefe tRNA verwendet (Bahn 2). Der eingesetzte ³²P-endmarkierte Primer hybridisierte mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a mRNA (Nukleotide + 256 bis + 276 in der cDNA-Sequenz). Die Extensionsprodukte wurden in einem 6%igen denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenmarker wurde eine Sequenzierungsreaktion benutzt. Die Länge des Extensionsproduktes, dessen Position durch einen Pfeil gekennzeichnet ist, betrug 304 Nukleotide.

25

Abb.7: Ermittlung des Transkriptionsstartpunktes durch S1 Nuklease-Kartierung. Eine der Gegenstrangsequenz entsprechende ³²P-endmarkierte Einzelstrangprobe, die den gesamten Bereich der 5' untranslatierten Region (- 2289 bis + 176) umfaßte, wurde mit 5
 30 µg Gesamt-RNA (Bahn 2) bzw. zytoplasmatischer Gesamt-RNA (Bahn 3) aus serumkultivierten CHO-Zellen hybridisiert. Als Kontrolle wurde 5 µg Hefe tRNA eingesetzt (Bahn 1). Die vor dem S1 Nuklease-Abbau geschützten Fragmente wurden in einem 8%igen denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Größenmarker diente eine Sequenzierungsreaktion, in der der zur eingesetzten Hybridisierungsprobe komplementäre DNA-Strang sequenziert wurde. Der zur Sequenzierung benutzte Primer hybridisierte dabei mit der Nukleotidsequenz von + 157 bis + 176. Die Positionen der abbaugeschützten DNA-Fragmente
 35 sind in der hervorgehobenen Sequenz durch Pfeile markiert. Dem distalen Transkriptionsstartpunkt wurde die Nukleotidposition +1 zugeordnet.

Abb. 8: Funktionelle Analyse der Ub/S27a-Promotoraktivität. Vektorkonstrukte, in denen serielle Deletionen der 5' flankierenden Region des Ub/S27a-Gens in beiden Orientierungen mit dem CAT-Reportergen fusioniert worden waren, wurden zur transienten Transfektion von serumkultivierten CHO-Zellen eingesetzt. Als Kontrolle wurden Plasmide eingesetzt, in denen das CAT-Reportergen unter der Kontrolle eines viralen Promotors stand. Insgesamt wurden vier voneinander unabhängige Transfektionsexperimente durchgeführt.

Die relative CAT-Aktivität der verschiedenen Vektorkonstrukte ist als Prozent der CAT-Aktivität in pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen, die als 100% angenommen wurde, angegeben und repräsentiert den Mittelwert (Standardabweichung in allen Fällen $\leq 5\%$) aus den vier Transfektionsexperimenten. Sämtliche CAT-Aktivitäten wurden bezüglich eingesetzter Proteinmenge sowie Transfektionseffizienz, die durch Messung der β -Galactosidase-Aktivität des co-transfizierten Kontrollplasmides pCMVtklacZ bestimmt wurde, korrigiert.

- ☐ Kontrollplasmide: ohne Promotor oder virale Promotoren (tk, SV40)
- ☒ Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 5'-3' Orientierung in pBL-CAT6
- ☒ Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 3'-5' Orientierung in pBL-CAT6

Abb. 9: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in transient transfizierten BHK-Zellen (BHK21).

- ☐ Kontrollplasmide: ohne Promotor oder virale Promotoren (tk, SV40)
- ☒ Ub/S27a 5' untranslatierte Region: 5'-3' Orientierung in pBL-CAT6

Abb. 10: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (I). Dargestellt ist die CAT-Aktivität in Zellen, die mit dem Vektor pCMVtkCAT (tk-Promotor/CMV-Enhancer) oder dem Vektor pBL-CAT5 (tk-Promotor) stabil transfiziert wurden (vgl. Beispiele/Plasmide, Beispiel 6). Gezeigt sind jeweils mehrere verschiedene Klone. Die CAT-Aktivität ist auf die Aktivität des Klons pCMVtkCAT 6, der die höchste Aktivität hatte, normiert (=100%). Die Graphik dient dem Vergleich mit den Abbildungen 11 und 12.

Abb. 11: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (II). Gezeigt ist die CAT-Aktivität verschiedener Vektorkonstrukte, die als Prozent der CAT-Aktivität des Klons 6 der mit pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen aus Abb. 10 dargestellt ist. Fragmente aus der Promotorregion gemäß Tabelle 1 wurden in pBL-CAT6 in 5' → 3'-Orientierung integriert. Die Abszisse gibt an, welches Fragment verwendet wurde. Gezeigt ist die Aktivität von jeweils mehreren verschiedenen Klonen.

Abb. 12: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (III). Gezeigt ist die CAT-Aktivität verschiedener Vektorkonstrukte, die als Prozent der CAT-Aktivität des Klons 6 der mit pCMVtkCAT transfizierten CHO-Zellen aus Abb. 10 dargestellt ist. Fragmente aus der Promotorregion gemäß Tabelle 1 wurden in pBL-CAT6 in 5' → 3'-Orientierung integriert. Die Abszisse gibt an, welches Fragment verwendet wurde. Gezeigt ist die Aktivität von jeweils mehreren verschiedenen Klonen.

Abb. 13: Funktionelle Analyse der Aktivität des Ub/S27a-Promotors in stabil transfizierten CHO-Zellen (IV). Diese Abbildung stellt eine Zusammenfassung der Daten der Abbildungen 10 bis 12 dar. Gezeigt sind die Zellklone mit der höchsten und der niedrigsten CAT-Expression für jedes Vektorkonstrukt, das in diesem Experiment verwendet wurde (nur Plasmide mit 5' → 3'-Orientierung des Ub/S27a-Promotors).

Beispiele

Plasmide

Für die Durchführung sämtlicher Genmanipulationen wurde der Vektor pBluescript SK- verwendet (Stratagene Cloning Systems, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Zur Expressionsanalyse wurden eukaryontische Expressionsvektoren eingesetzt, die das als Reportergen dienende bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Gen enthielten. Das CAT-Gen ist dabei mit verschiedenen viralen Promotoren fusioniert. In pBL-CAT5 ist es der Thymidinkinasepromotor (tk) des Herpes simplex Virus (Boshart et al., 1992; kompilierte Sequenz zugänglich über GenBank Accession No. M80483), in pCMVtkCAT der

tk-Promotor in Kombination mit einem Enhancer des humanen Cytomegalievirus (CMV) (Christoph Winkler, Würzburg) und in pKSSV2CAT der SV40-Promotor (Tsonis et al., 1988). pBL-CAT6 diente als Negativkontrolle und enthält ein promotorloses CAT-Gen (Boshart et al., 1992; kompilierte Sequenz zugänglich über GenBank Accession No. M80484). Im Vektor pCMVtklacZ steht die Expression des bakteriellen β -Galactosidase-Gens unter der Kontrolle der CMV-Enhancer/tk-Promotorkombination (Christoph Winkler, Würzburg).

10 Zellkultur

CHO-DUKX Zellen (Urlaub und Chasin, 1980) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's F12 Medium (1:1), supplementiert mit 5% fötalem Kälberserum, in Roux-Flaschen in einem CO₂ begasbaren Brutschrank bei 90% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die serumfreie Kultivierung wurden CHO-DUKX Zellen verwendet, die langsam an ein Wachstum in Medium ohne Serum adaptiert worden waren und nun permanent in serumfreiem Medium kultiviert werden. Diese Zellen wurden als Suspensionskulturen in Spinnerflaschen in Iscove's Modified Dulbecco's Medium/Ham's F12 Medium (1:1) kultiviert, das mit niedermolekularem Pepton (Aldag, Hamburg), Insulin und Transferrin (Canada Packars) supplementiert wurde.

Beispiel 1: Differentielle Hybridisierung rekombinanter CHO cDNA Genbanken

Unter Verwendung von polyadenylierter mRNA aus CHO-Zellen, die entweder in Serum oder ohne Serum kultiviert worden waren, wurden zunächst zwei cDNA Genbanken in λ ZAPII, bestehend aus 4.2×10^6 bzw. 2.9×10^5 rekombinanten Phagenklonen, hergestellt.

Die zytoplasmatische RNA wurde von NP40-lysierten Zellen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt (Nicolaidis und Stoeckert, 1990). Polyadenylierte mRNA von CHO-Zellen, die mit oder ohne Serum kultiviert worden waren, wurde durch Affinitätschromatographie an einer Oligo(dT)-Cellulosesäule gewonnen (Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung der cDNA wurde das cDNA Synthesekit von Pharmacia LKB verwendet, wobei zur Erststrangsynthese ein Oligo (dT)-Primer eingesetzt wurde. Die cDNA wurde in den EcoRI-verdauten Vektor λ ZAPII kloniert (Stratagene Cloning Systems). Filterduplikate der nicht-amplifizierten CHO cDNA Genbank aus serumfrei kultivierten CHO-Zellen wurden durch differentielle Hybridisierung gescreent. Als Probe wurde Gesamt-

cDNA von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen eingesetzt, die durch "random priming" (Prime a Gene labelling Kit; Promega Cooperation, Promega Biotec, Madison, WI, USA) mit (α - ^{32}P) dCTP (6000 Ci/mmol; Amersham International plc, Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert worden war. Die Hybridisierung wurde wie in der Northern Blot Analyse (s.u., Beispiel 2) beschrieben durchgeführt. Phagenplaques, die mit beiden cDNA-Proben eine starke Hybridisierung zeigten, wurden isoliert und nochmals einer differentiellen Hybridisierung unterzogen. Aus den rekombinanten λ ZAPII Phagen wurden Phagemide durch *in vivo* Exzision unter Einsatz des Helferphagen R408 gewonnen (λ ZAPII cloning kit-Protokoll; Stratagene Cloning Systems).

Ungefähr 6000 Phagenklone wurden so gescreent. Insgesamt wurden 12 rekombinante Phagenklone isoliert, die eine besonders starke Hybridisierung mit beiden Gesamt-cDNA-Proben zeigten.

DNA-Sequenzen wurden nach der Didesoxymethode unter Verwendung des T7 Sequenzierungskits von Pharmacia LKB ermittelt. Als Primer wurden sowohl T3 und T7 Promotorprimer als auch genspezifische Primer eingesetzt. In allen Fällen wurden die DNA-Proben mit [α - ^{35}S] dATP bzw. [α - ^{35}S] dCTP (10 μCi ; Amersham International plc) markiert. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 6%igen Polyacrylamid-Sequenzierungsgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Sequenzanalyse wurden die Datenbanken von GenBank und EMBL herangezogen.

Einer der isolierten cDNA-Klone kodierte für ein Fusionsprotein, Ub/S27a, bestehend aus einer Ubiquitin-Monomereinheit und einem ribosomalen Protein der kleinen Untereinheit, S27a (Abb.1). Die größte Homologie besteht mit der humanen Ub/S27a-Sequenz (Adams et al., 1992) mit 92.2 % Homologie auf cDNA-Ebene und 100 % Homologie auf Aminosäure-Ebene. Die isolierte CHO Ub/S27a cDNA ist 508 bp groß und umfaßt die gesamte Kodierregion sowie ein Polyadenylierungssignal im 3' untranslatierten Bereich und zwei einander überlappende Translationsinitiationselemente in der 5' untranslatierten Region (Abb.1). Anhand der cDNA-Sequenz wird auch ersichtlich, daß es sich um ein echtes Fusionsgen handelt, d.h. beide Proteinanteile werden von einem einzigen Gen kodiert. Die Proteinsequenz des resultierenden Fusionsproteins ist hoch konserviert, wobei die ersten 76 Aminosäuren des 156 Aminosäure großen Proteins den Ubiquitinanteil umfassen (Abb.2).

Beispiel 2: Analyse der Ub/S27a-Genexpression

Das Ausmaß der Ub/S27a-Genexpression wurde in Northern Blot Experimenten, in denen zytoplasmatische Gesamt-RNA von serumkultivierten und serumfrei kultivierten CHO-Zellen verwendet wurde, untersucht.

Die zytoplasmatische RNA wurde von NP40-lysierten Zellen präpariert und durch Phenol/Chloroform-Extraktionen gereinigt (Nicolaidis und Stoeckert, 1990). Gesamt-RNA (10 µg) wurde elektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham International plc) transferiert (Sambrook et al., 1989) und durch eine 5minütige UV-Bestrahlung (254 nm) kovalent mit der Nylonmembran vernetzt. Die RNA-Filter wurden über Nacht bei 65°C in einer Lösung bestehend aus 4x SSC, 10x Denhardt, 0.1% SDS und 1×10^6 cpm/ml ^{32}P -markierter cDNA-Probe hybridisiert. Die cDNA-Fragmente wurden unter Verwendung von "random primer" markiert (Prime a Gene labeling kit; Promega Corporation), wobei die spezifische Aktivität der DNA-Proben $4 - 8 \times 10^8$ cpm/µg DNA betrug. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal in 0.2x SSC/0.1 % SDS bei 65°C für 20 Minuten gewaschen. Auf die in Haus-

haltsfolie eingewickelten Filter wurde ein Röntgenfilm (Curix; Agfa-Gevaert N.V.) gelegt und die Autoradiographie für 3 Stunden bei -70°C durchgeführt.

Sowohl in den unter Standardbedingungen mit Serum kultivierten CHO-Zellen als auch in den an das Wachstum in serumfreiem Medium adaptierten CHO-Zellen ließen sich Ub/S27a-Transkripte mit einer Länge von ungefähr 600 Nukleotiden in großer Zahl und gleichen Mengen nachweisen (Abb.3). Bei den beiden zusätzlichen Transkripten von ungefähr 1500 und 2800 Nukleotiden handelt es sich um Polyubiquitintranskripte, in denen mehrere Ubiquitin-Monomereinheiten miteinander fusioniert sind. Die Polyubiquitintranskripte, die unter diesen Kulturbedingungen zu einem erheblich geringeren Level exprimiert werden, hybridisieren mit dem Ubiquitinanteil der in den Northern Blot Analysen als Probe eingesetzten Ub/S27a cDNA. Der Ub/S27a Transkriptlevel blieb unverändert hoch, wenn die permanent in serumfreiem Medium wachsenden CHO-Zellen für 24 h in serumhaltigem Medium kultiviert wurden (Abb.3). Ein anderes Bild bot sich, wenn die unter Standardbedingungen serumkultivierten CHO-Zellen für 24 h in serumfreies Medium überführt wurden. Die Zahl der Ub/S27a-Transkripte nahm erheblich ab (Abb.3). Dieses ist darauf zurückzuführen, daß sich der überwiegende Teil der CHO-Zellen während dieser 24stündigen Kultivierungsphase in serumfreiem Medium nicht mehr teilten und zudem eine Reduktion im Zellvolumen aufwiesen. In Zellen, die ein solches Stadium erreicht haben, findet, wenn überhaupt, nur noch eine geringe Transkription statt.

Beispiel 3: Isolierung und Analyse der Ub/S27a-Promotorregion

Zur Isolierung der Promotorregion des Ub/S27a-Gens wurde zunächst eine genomische CHO-Genbank mit über eine Million rekombinanter Phagenklone hergestellt, wobei
5 genomische DNA von serumkultivierten CHO-Zellen verwendet wurde.

Die genomische DNA wurde von NP40-lysierten Zellen nach einem Protokoll von Nicolaides und Stoeckert gewonnen (Nicolaides & Stoeckert, 1990). Im Gegensatz zu der beschriebenen Auszuchtungs-methode wurde die DNA jedoch nach dem Proteinase K1 Verdau
10 dreimal mit Phenol/ Chloroform extrahiert.

Die DNA-Enden von partiell mit Sau3AI verdauter genomischer DNA mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 20 kb wurden halbseitig unter Verwendung von dGTP und dATP aufgefüllt und mit XhoI-verdaulichem Vektor λGEM-12 (halbseitig mit
15 dTTP und dCTP aufgefüllte DNA-Enden; Promega Corporation) ligiert. Zur Verpackung wurden kommerziell erhältliche Extrakte eingesetzt (Gigapack II Plus packaging extracts; Stratagene Cloning Systems).

Diese genomische Genbank wurde lediglich mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a-cDNA
20 hybridisiert, um eine Kreuzhybridisierung mit den Polyubiquitinen zu vermeiden. Einer der isolierten Genomklone mit einer Gesamtlänge von 14 kb enthielt unter anderem die komplette Kodierregion und 2.5 kb der 5' untranslatierten Region. Die Kodierregion wird durch drei Introns mit korrekten Konsensussequenzen an den Exon/Intron- und Intron/Exon-Übergängen unterbrochen (Breathnach & Chambon, 1981), wobei zwei dieser
25 Introns im Ubiquitinanteil und das dritte Intron im S27a-Anteil lokalisiert sind (Abb.1).

Beide DNA-Stränge der 5' untranslatierten Region wurden komplett sequenziert (Methode s. Beispiel 1). Das geschah durch Sequenzierung von subklonierten Restriktionsfragmenten sowie durch Sequenzierung von überlappenden Deletionsklonen, die durch
30 Exonuklease III Verdau erzeugt worden waren (Abb.4). Die potentielle Promotorregion enthält keine TATA-Box, dafür aber einen CpG-reichen Sequenzbereich (67% GC von -144 bis +129), in dem auch die singuläre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 (Dyran & Tjian, 1983) und je eine Restriktionsschnittstelle für EagI und SacII, die für solche GC-reiche Regionen spezifisch sind, liegen, sowie polypyrimidinreiche Sequenzbereiche
35 (Abb.5).

Zur Lokalisierung des Transkriptionsstartpunktes wurden sowohl Primer-Extension als auch S1 Nuklease-Kartierung an Gesamt-RNA von serumkultivierten CHO-Zellen vor-

genommen. Um eine Extension von Polyubiquitin-Transkripten zu vermeiden, wurde für die Primer-Extension ein Primer verwendet, der mit dem S27a-Anteil der Ub/S27a mRNA hybridisierte (komplementär zu den Nukleotiden + 256 - 276 bp in der cDNA-Sequenz).

5 Ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GTGGTGTAGGACTTCTTCTTC-3', komplementär zu den Nukleotiden + 256 bis + 276 in der Ub/S27a cDNA-Sequenz, wurde mit 5 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA aus serumkultivierten CHO-Zellen hybridisiert und verlängert (Ausubel et al., 1987).

10 Die zur S1 Nuklease-Kartierung eingesetzte Einzelstrangprobe, die den Bereich von -2289 bis + 176 der genomischen Ub/S27a-Sequenz umfaßte, wurde über PCR wie folgt gewonnen. Die 5' untranslatierte Region der Ub/S27a-Genomsequenz (-2289 bis + 240) wurde in 5' - 3' Orientierung in den Vektor pBluescript SK- (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Dieses Hybridplasmid wurde in der PCR als Matrize eingesetzt. Zur Amplifizierung wurden ein biotinylierter T3-Promotorprimer und ein mit [γ -³²P] ATP-markierter Ub/S27a-spezifischer Primer (5'-CTCGAGCGTGATCGTTTTCC-3', komplementär zu den Nukleotiden + 157 bis + 176 der Ub/S27a-Genomsequenz) verwendet. Die Gewinnung des zur RNA-Sequenz komplementären Einzelstranges erfolgte durch alkalische Denaturierung des an magnetische Streptavidinbeads gebundenen PCR-Produktes (Dynabeads M-280 Streptavidin Protokoll; Dynal A.S., Norway). 2 x 10⁵ cpm der Einzelstrangprobe wurden mit 5 µg Gesamt-RNA aus serumkultivierten CHO-Zellen über Nacht bei 55°C hybridisiert und die Hybridisierungsprodukte wurden nachfolgend mit S1 Nuklease behandelt (Ausubel et al., 1987).

25 Das über Primer-Extension erhaltene Produkt wies eine Länge von 304 Nukleotiden auf (Abb.6), womit der Transkriptionsstartpunkt 44 bp stromaufwärts vom Startkodon innerhalb eines Polypyrimidinelements liegen würde (Abb.5). Dieser Startpunkt konnte durch die S1 Nuklease-Kartierung allerdings nicht verifiziert werden. Über die S1 Nuklease-Kartierung wurden zwei Transkriptionsstartpunkte ermittelt (Abb.7), die 128 bp bzw. 116 bp stromaufwärts vom Startkodon innerhalb einer Polypyrimidinsequenz liegen und deren Positionen im nachfolgenden als Position +1 und +13 angegeben werden (Abb.5, Abb.7). Die wahrscheinlichste Erklärung für die zu beobachtende Diskrepanz zwischen den beiden Kartierungsmethoden ist eine vorzeitige Terminierung der Primer-Extensionsreaktion. Bedingt durch die Positionierung des Primers in der S27a-Sequenz liegt die Länge des zu erwartenden Extensionsproduktes mit über 300 Basen über der optimalen Länge von ungefähr 100 Basen. Je größer die Entfernung zwischen der Primerposition und der gesuchten Transkriptionsstartstelle ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines vorzeitigen Abbruchs der reversen Transkription durch GC-reiche Sequenzen und Sekundärstrukturausbildungen

innerhalb der mRNA. Für die S1 Nuklease-Kartierung wurde hingegen eine den gesamten 5' untranslatierten Bereich umfassende Einzelstrangprobe eingesetzt (Sequenzbereich - 2289 bis + 176; Abb.5), die aus einem PCR-Produkt gewonnen wurde, wodurch die bei der Primer-Extension auftretenden Probleme der reversen Transkription von GC-reichen Sequenzen umgangen wurden.

Unsere Untersuchungen der 2.5 kb großen 5' untranslatierten Region zeigten, daß der mögliche Promotor weder eine TATA-Box noch eine CAAT-Box besaß. Dafür aber zeichnete sich die stromaufwärts vom Startkodon gelegene Sequenz durch einen hohen GC-Gehalt aus. Innerhalb dieser Sequenz wurde eine singuläre Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 vorgefunden. Über S1 Nuklease-Kartierung wurden zwei prominente Transkriptionsstartpunkte, die innerhalb einer Polypyrimidinsequenz 128 bzw. 116 bp stromaufwärts vom Startkodon lagen, identifiziert.

15

Beispiel 4: Identifizierung und Eingrenzung des Sequenzbereiches mit Promotoraktivität

Herstellung von Deletionsklonen durch Exonuklease III Verdau

Über Exonuklease III-Verdau wurde eine Serie von 5' Deletionsklonen hergestellt (Tab.1). Die 5' untranslatierte Region des Ub/S27a-Gens (-2289 bis + 240) wurde dazu in beiden Orientierungen in die HincII-Schnittstelle des Vektors pBluescript SK- (Stratagene Cloning Systems) kloniert. Zur Einführung von unidirektionalen Deletionen wurden diese Hybridplasmide mit KpnI und XhoI verdaut und mit Exonuklease III, wie in dem Protokoll des eingesetzten "Erase-a-base"-Kits beschrieben (Promega Corporation), behandelt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden als BamHI-Fragmente in die singuläre BamHI-Schnittstelle des Vektors pBL-CAT6 integriert.

Vor Beginn des Exonuklease III-Verdaus kann der Vektor pBluescript Sk- auch durch Einführung von Adaptoren, die geeignete Restriktionsschnittstellen enthalten, modifiziert werden, um nachfolgende Genklonierungsexperimente zu erleichtern. So können neben BamHI auch noch andere Restriktionsenzym-schnittstellen zu Klonierungszwecken herangezogen werden, z.B. nach dem Schema

35

NotI-XbaI-SpeI-BamHI-SmaI-EcoRI-3' Ende 5' Ende-SalI/HincII-BamHI
5' Deletionsfragment

Tab. 1: Zusammenstellung der durch Exonuklease III-Verdau hergestellten 5' Deletionsklone der Ub/S27a 5' untranslatierten Region

5' Deletionsfragment	5' Ende des Fragmentes	3' Ende des Fragmentes
1612 bp	Position - 1501	Position + 111
806 bp	Position - 695	Position + 111
483 bp	Position - 372	Position + 111
272 bp	Position - 161	Position + 111
156 bp	Position - 45	Position + 111

Die Positionsangaben beziehen sich auf die Numerierung der in Abbildung 5 dargestellten genomischen Ub/S27a-Sequenz.

Alle Deletionsklone haben ein gemeinsames 3' Ende (Position + 111), das zwischen den Transkriptionsstartstellen und dem Startkodon liegt (Abb. 5). Das größte Fragment umfaßt 1.7 kb und das kleinste Fragment 150 bp (Tab.1). Letzteres ist das einzige Fragment, das nicht mehr die singuläre Sp1-Bindungsstelle enthält. Diese potentiellen Promotorregionen wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pBL-CAT6 vor das promotorloses CAT-Gen, das als Reportergen diente, kloniert und zur transienten Transfektion von serumkultivierten CHO-Zellen eingesetzt.

DNA-vermittelte Zelltransfektion und CAT-Assay

Am Vortag der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro 20 cm² Schale ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg Plasmid-DNA (CAT-Reporterkonstrukte) und 500 ng des Plasmides pCMVtklacZ unter Verwendung einer modifizierten Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert (Chen & Okayama, 1987). Die β-Galactosidase-Aktivität des Kontrollvektors pCMVtklacZ wurde dabei zur Bestimmung der Transfektionseffizienz herangezogen. Überschüssiges DNA-Präzipitat wurde nach 4stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch Waschen mit PBS entfernt.

Nach einer Inkubationsperiode von 48 Stunden wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurde je 1 ml eiskalter NTE-Puffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA) in die Schalen gegeben und die Zellen wurden mit Hilfe eines Schabers von den Schalen abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die Zellen wurden durch 3minütige Zentrifugation bei 9000 rpm pelletiert, in 70 µl 0.25 M Tris-HCl pH 7.8 resus-

pendiert und bei - 70°C gelagert. Für die Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität nach der Methode von Sleigh wurden jeweils 30 µl der Zellsuspension eingesetzt (Sleigh, 1986). Eine Normalisierung der relativen CAT-Aktivität jeder Transfektion wurde auf der Basis der nach der Methode von Norton und Coffin bestimmten β-Galactosidase-Aktivität vorgenommen (Norton & Coffin, 1985). Für diesen Test wurden jeweils 10 µl der Zellsuspension eingesetzt. In allen Fällen wurde außerdem eine Korrektur bezüglich der eingesetzten Proteinmenge vorgenommen. Die Proteinkonzentration wurde dabei nach der Bradford-Methode bestimmt (Ausubel et al., 1987).

10 In dem Histogramm in Abbildung 8 sind die Ergebnisse aus vier unabhängig voneinander durchgeführten transienten Expressionsexperimenten dargestellt. Zur Kontrolle wurden Plasmide eingesetzt, in denen die CAT-Genexpression durch einen konstitutiven viralen Promotor gesteuert wird. In pBL-CAT5 ist es der Thymidinkinasepromotor des Herpes simplex Virus. In pCMVtkCAT liegt dieser Promotor in Kombination mit einem Enhancer
15 des humanen Cytomegalievirus vor und in pKSSV2CAT handelt es sich um den SV40-Promotor. pBL-CAT6 diente als Negativkontrolle und enthält ein promotorloses CAT-Gen.

Mit Ausnahme des 156 bp Fragmentes zeigten alle Ub/S27a-Fragmente, die in 5'-3' Orientierung vor das promotorlose CAT-Reportergen kloniert worden waren, eine starke
20 Promotoraktivität, die 2.5 bis 3mal höher war als die des tk-Promotors des Herpes simplex Virus (Abb.8). Die stärkste Promotoraktivität, die mit der des SV40- Promotors in pKSSV2CAT vergleichbar war, wiesen dabei die Fragmente von 483 bp und 272 bp auf. Lediglich die virale CMV-Enhancer/tk-Promotor-Kombination in pCMVtkCAT resultierte in einer noch um ungefähr 10% höheren CAT-Aktivität. Bei einer bis zur Position - 45 reichenden Deletion (156 bp Fragment), die auch die singuläre Sp1-Bindungsstelle umfaßte,
25 war keine CAT-Aktivität mehr feststellbar (Abb.8). Die Ub/S27a 5' untranslatierte Region, die für die Vermittlung einer starken Promotoraktivität ausreichend ist, läßt sich somit auf den Bereich von - 161, dem 5' Ende des 272 bp Fragmentes, bis - 45, dem 5' Ende des 156 bp Fragmentes, eingrenzen. Innerhalb dieses 117 bp umfassenden Bereiches liegt auch die
30 singuläre Sp1-Bindungsstelle.

Ein unerwartetes Resultat war die Beobachtung, daß die kürzeren Fragmente auch in der 3'-5' Orientierung eine Promotoraktivität aufwiesen (Abb.8). Allerdings ist dieser auf dem Gegenstrang lokalisierte Promotor nicht so stark wie der Ub/S27a-Promotor, sondern
35 um 42% reduziert. Auch hier zeigten die Fragmente von 483 bp und 272 bp die größte Aktivität. Diese Aktivität war mit der des tk-Promotors in pBL-CAT5 vergleichbar. Das zugehörige Gen, dessen Expression von diesem Gegenstrangpromotor aus gesteuert wird, kann

te bisher noch nicht identifiziert werden. Es könnte sich also bei dem oben erwähnten 117 bp Promotorbereich sogar um eine bidirektionale Promotorregion handeln.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß mit dem von den Erfindern der vorliegenden Erfindung isolierten Ub/S27a-Promotor aus CHO-Zellen erstmals ein sehr starker konstitutiver homologer Promotor des Hamsters bereitgestellt wird. Untersuchungen an stabil transfizierten serumkultivierten CHO-Zellen belegen, daß der Ub/S27a-Promotor auch nach der Integration in das Zellgenom äußerst aktiv ist und für eine sehr starke Expression des CAT-Reportergenesis sorgt.

Beispiel 5: Transiente Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des Ub/S27a-Promotors in BHK-Zellen

CAT-Reporterkonstrukte, die verschiedene Fragmente der Ub/S27a-Promotorregion enthielten, wurden analog in BHK-21-Zellen (ATCC CCL 10) eingebracht und die CAT-Aktivität der Transfektanten gemessen. Abb. 9 zeigt, daß mit den erfindungsgemäßen Promotorsequenzen auch in BHK-Zellen eine außerordentlich hohe Expressionsrate erzielt werden kann.

Beispiel 6: Stabile Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des Ub/S27a-Promotors in CHO-Zellen

Stabile Transfektanten wurden wie folgt hergestellt. Am Vortag der Transfektion wurden 200.000 Zellen pro 20-cm²-Schale ausgesät. Die Zellen wurden mit 10 µg Plasmid-DNA (CAT-Reporterkonstrukte) und 500 ng des Plasmides pSV2pac (Vara *et al.*, 1986) unter Verwendung einer modifizierten Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert (Chen & Okayama, 1987). Das Plasmid pSV2pac trägt das für die Puromycin-N-Acetyltransferase (pac) kodierende Gen und vermittelt somit Resistenz gegen das die Proteinbiosynthese hemmende Antibiotikum. Überschüssiges DNA-Präzipitat wurde nach 4stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch Waschen mit PBS entfernt. Nach 24 weiteren Stunden wurde mit der Selektion der Transfektanten durch Zugabe von 10 µg/ml Puromycin gestartet. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit Puromycin-haltigem Medium. Über Verdünnungsklonierung der selektionierten Transfektanten wurden Einzelzellklone gewonnen.

Abb. 10-12 zeigen CAT-Expressionsraten verschiedener Klone stabiler Transfektanten relativ zu pCMVtkCAT cl.6 (Klon 6, der pCMVtkCAT-transfizierte Zellklon mit der höchsten CAT-Aktivität).

5

Literatur

- Adams, S.M., Sharp, M.G., Walker, R.A., Brammar, W.J. & Varley, J.M. (1992)
10 Differential expression of translation-associated genes in benign and malignant human breast tumours
Br.J.Cancer 65, 65 - 71
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. &
15 Struhl, K. (1987)
Current protocols in molecular biology
Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience
- Baker, R.T. & Board, P.G. (1991)
20 The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes
Nucleic Acids Research 19, 1035 - 1040
- Boshart, M., Klüppel, M., Schmidt, A., Schütz, G. & Luckow, B. (1992)
25 Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene
Gene 110, 129 - 130
- Breathnach, R. & Chambon, P. (1981)
Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins
30 Ann.Rev.Biochem. 50, 349 - 383
- Chen, C. & Okayama, H. (1987)
High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA
J. Mol. Cell. Biol. 7, 2745 - 2752
35
- Ciechanover, A. (1994)
The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway
Cell 79, 13 - 21

- Dynan, W.S. & Tjian, R. (1983)
The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter
5 Cell 35, 79 - 87
- Faisst, S. & Meyer, S. (1992)
Compilation of vertebrate-encoded transcription factors
Nucleic Acids Research 20, 3 - 26
10
- Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. (1989)
The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis
Nature 333, 394 - 401
15
- Fornace, A.J., Alama, I., Hollander, M.C. & Lamoreaux, E. (1989)
Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells
Nucleic Acids Research 17, 1215 - 1230
- 20 Huxley, C. & Fried, M. (1990)
The mouse rpL7a gene is typical of other ribosomal protein genes in it's 5' region but differs in being located in a tight cluster of CpG-rich islands
Nucleic Acids Research 18, 5353 - 5357
- 25 Jentsch, S., Seufert, W. & Hauser, H.-P. (1991)
Genetic analysis of the ubiquitin system
Biochimica et Biophysica Acta 1089, 127 - 139
- Kaufman R. J. (1987)
30 High level production of proteins in mammalian cells
In: Genetic Engineering: Principles and methods (Hrsg. J K Setlow), Bd. 9, S. 155
Plenum Publishing, New York
- Luckow, B., Schütz, G. (1987)
35 CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements
Nucleic Acids Res. 15, 5490

- Luo, X. & Kim, K.-H. (1990)
An enhancer element in the house-keeping promoter for acetyl-CoA carboxylase gene
Nucleic Acids Research 18, 3249 - 3254
- 5 Meyer, J., Nick, S., Stamminger, T., Grummt, F., Jahn, G. & Lipps, H.J. (1993)
Inhibition of HIV-1 replication by a high-copy-number vector expressing antisense RNA for
reverse transcriptase
Gene 129, 263 - 268
- 10 Nicolaides, N.C. & Stoeckert, C.J. (1990)
A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells
BioTechniques 8, 154 - 155
- Norton, P.A. & Coffin, J.M. (1985)
- 15 Bacterial β -galactosidase as a marker of Rous Sarcoma virus gene expression and replica-
tion
Mol. Cell. Biol. 5, 281 - 290
- Redman, K.L. & Rechsteiner, M. (1989)
- 20 Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a
Nature 338, 438 - 440
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: A Laboratory Manual
- 25 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Schlesinger, M.J. & Bond, U. (1987)
Ubiquitin genes
Oxf. Survey Euk. Genes 4, 77 - 91
- 30 Shimbara, N., Sato, C., Takashina, M., Tanaka, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. (1993)
Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells
FEBS Letters 322, 235 - 239
- 35 Sleight, M.J. (1986)
A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene
in eukaryotic cells
Anal. Biochem. 156, 252 - 256

- Urlaub, G. & Chasin, L.A. (1980)
Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 - 4220
- 5 Tsonis, P.A., Manes, T., Millan, J.L. & Goetinck, P.F. (1988)
CAT constructs with convenient sites for cloning and generating deletions
Nucleic Acids Research 16, 7745
- 10 Vara, J.A., Portela, A., Ortin, J. & Jiménez, A. (1986)
Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin
resistance
Nucleic Acids Research 14, 4617 - 4624
- 15 Wegner, M., Zastrow, G., Klavinius, A., Schwender, S., Müller, F., Luksza, H., Hoppe, J.,
Wienberg, J. & Grummt, F. (1989)
Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persi-
stence in mouse cells: implication of HMG-I in their function
Nucleic Acids Research 17, 9909 - 9932
- 20 Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A. & Vuust, J. (1985)
The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubi-
quitin coding sequences
EMBO J. 4, 755 - 759
- 25 Wong, J.M., Mafune, K., Yow, H., Rivers, E.N., Ravikumar, T.S., Steele, G.D. & Chen,
L.B. (1993)
Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an
early growth response gene
- 30 Cancer Research 53, 1916 - 1920

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
- (B) STRASSE: Binger Str.
- (C) ORT: Ingelheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 55216
- (G) TELEFON: 06132-772770
- (H) TELEFAX: 06132-774377

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Starker homologer Promotor aus Hamster

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 508 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: beides

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```

TGGAACCGCC GCCAAGATGC AGATTTTCGT GAAGACCCTT ACGGGGAAAA CGATCACGCT   60
CGAGGTTGAA CCCTCGGACA CTATAGAAAA TGTAAGGCC AAGATCCAGG ATAAGGAAGG  120
AATTCCTCCT GACCAGCAGA GGCTGATCTT TGCTGGTAAG CAACTGGAAG ATGGCCGTAC  180
TTTGTCTGAC TACAACATCC AAAAGGAGTC CACCCTTCAT CTTGTGTTGA GACTTCGTGG  240
TGGTGCTAAG AAGAGGAAGA AGAAGTCCTA CACCACTCCC AAGAAGAATA AGCATAAGAG  300
AAAGAAGGTT AAGTTGGCTG TGCTGAAGTA CTATAAGGTG GATGAAAATG GCAAAATTAG  360
TCGCCTTCGT CGAGAGTGTC CATCTGATGA GTGTGGTGCT GGAGTTTTCA TGGCTAGCCA  420
TTTTGACAGA CATTACTGTG GCAAGTGTTG TCTGACTTAC TGCTTCAACA AACCAGAAGA  480
CAAGTAGTTG TGTATGAATA AATAAAAA                                     508
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 487 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: beides

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

TGGAGCCGCA ACCAAATGC AGATTTTCGT GAAAACCCTT ACGGGGAAGA CCATCACCCCT   60
CGAGGTTGAA CCCTCGGATA CGATAGAAAA TGTAAAGGCC AAGATCCAGG ATAAGGAAGG  120
AATTCCTCCT GATCAGCAGA GACTGATCTT TGCTGGCAAG CAGCTAGAAG ATGGACGTAC  180
TTTGTCTGAC TACAATATTC AAAAGGAGTC TACTCTTCAT CTTGTGTTGA GACTTCGTGG  240
TGGTGCTAAG AAAAGGAAGA AGAAGTCTTA CACCACTCCC AAGAAGAATA AGCACAAGAG  300
AAAGAAGGTT AAGCTGGCTG TCCTGAAATA TTATAAGGTG GATGAGAATG GCAAATTAG  360
TCGCCTTCGT CGAGAGTGCC CTTCTGATGA ATGTGGTGCT GGGGTGTTTA TGGCAAGTCA  420
CTTTGACAGA CATTATTGTG GCAAATGTTG TCTGACTTAC TGTTTCAACA AACCAGAAGA  480
CAAGTAA                                         487
  
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 156 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1           5           10           15
Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
          20           25           30
Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
  
```

28

	35		40		45											
Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu	
50						55					60					
Ser	Thr	Leu	His	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg	
65					70					75					80	
Lys	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Lys	Lys	Asn	Lys	His	Lys	Arg	Lys	
				85					90					95		
Lys	Val	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asp	Glu	Asn	Gly	
			100					105					110			
Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Cys	Pro	Ser	Asp	Glu	Cys	Gly	Ala	
		115					120					125				
Gly	Val	Phe	Met	Ala	Ser	His	Phe	Asp	Arg	His	Tyr	Cys	Gly	Lys	Cys	
130						135					140					
Cys	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Asn	Lys	Pro	Glu	Asp	Lys					
145					150					155						

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 156 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu	
1				5					10					15		
Val	Glu	Pro	Ser	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Ile	Gln	Asp	
			20					25					30			
Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Pro	Asp	Gln	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys	
		35					40					45				
Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu	
50						55					60					
Ser	Thr	Leu	His	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg	
65					70					75					80	
Lys	Lys	Lys	Ser	Tyr	Thr	Thr	Pro	Lys	Lys	Asn	Lys	His	Lys	Arg	Lys	
				85					90					95		
Lys	Val	Lys	Leu	Ala	Val	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Val	Asp	Glu	Asn	Gly	

29

		100						105					110		
Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Arg	Arg	Glu	Cys	Pro	Ser	Asp	Glu	Cys	Gly	Ala
		115					120					125			
Gly	Val	Phe	Met	Ala	Ser	His	Phe	Asp	Arg	His	Tyr	Cys	Gly	Lys	Cys
	130					135					140				
Cys	Leu	Thr	Tyr	Cys	Phe	Asn	Lys	Pro	Glu	Asp	Lys				
145					150					155					

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2529 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

```

GATCTCCAGG ACAGCCATGG CTATTACACA GAGAAACCCT GTCTGGAAAA ACAAAAATT 60
AGTGTCCATG TGTAATGTG TGGAGTATGC TTGTCATGCC ACATACAGAG GTAGAGGGCA 120
GTTTATGGGA GTCAGTTCCT ATTCTTCCTT TATGGGGGAC CTGGGGACTG AACTCAGGTC 180
ATCAGGCTTG GCAGAAAGTG CATTAGCTCA CGGAGCCTTA TCATTGGCGA AAGCTCTCTC 240
AAGTAGAAAA TCAATGTGTT TGCTCATAGT GCAATCATTA TGTTTCGAGA GGGGAAGGGT 300
ACAATCGTTG GGGCATGTGT GGTACATCT GAATAGCAGT AGCTCCCTAG GAGAATTCCA 360
AGTTCTTTGG TGGTGTATCA ATGCCCTTAA AGGGGTCAAC AACTTTTTTT CCCTCTGACA 420
AACTATCTT CTTATGTCCT TGTCCCTCAT ATTTGAAGTA TTTTATTCTT TGCAGTGTTG 480
AATATCAATT CTAGCACCTC AGACATGTTA GGTAAGTACC CTACAACTCA GGTAACTAA 540
TTTAATTTAA CTAATTTAAC CCAACACTT TTTCTTTGTT TATCCACATT TGTGGAGTGT 600
GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGC 660
CGCGCGCGCT CGGATCATTC TACCTTTTGT TAAAAAATG TTAGTCCAGG GGTGGGGTGC 720
ACTGTGAAAG TCTGAGGGTA ACTTGCTGGG GTCAGTTCTT TCCACTATAG GACAGAAGTC 780
CAGGTGTCAA CTCTTTACTG ACAGAACCAT CCAAATAGCC CTATCTAATT TTAGTTTTTT 840
ATTTATTTAT TTTTGTGTTT TCGAGACAGG GTTTCTCTGT GGCTTTGGAG GCTGTCCTGG 900
AACTAGCTCT TGTAGACCAG GCTGGTCTCG AACTCAGAGA TCCACCTGCC TCTGCCTCCT 960

```

GAGTGCTGGG ATTAAAGGCA TGCGCCACCA ACGCTTGGCT CTACCTAATT TTAAAAGAGA 1020
TTGTGTGTCA CAAGGGTGTC ATGTCGCCCT GCAACCACCC CCCCCCAAA AAAAAAAAAA 1080
AAAACTTCA CTGAAGCTGA AGCACGATGA TTTGGTTACT CTGGCTGGCC AATGAGCTCT 1140
AGGGAGTCTC CTGTCAAACA GAATCTCAAC AGGCGCAGCA GTCTTTTTTA AAGTGGGGTT 1200
ACAACACAGG TTTTTCGATA TCAGGCATTT TATCTAAGCT ATTTCCCAGC CAAAATGTG 1260
TATTTTGGAG GCAGCAGAGC TAATAGATTA AAATGAGGGA AGAGCCCACA CAGGTTATTA 1320
GGAAGATAAG CATCTTCTTT ATATAAAACA AAACCAAACC AAAGTGGAGG AGGTCTACCT 1380
TTAGGGATGG AAGAAAAGAC ATTTAGAGGG TGCAATAGAA AGGGCACTGA GTTTGTGAGG 1440
TGGAGGACTG GGAGAGGGCG CAACCGCTTT AACTGTCCTG TTTTGCCTAT TTTTGGGGA 1500
CAGCACATGT TCCTATTTTT CCCAGGATGG GCAATCTCCA CGTCCAACT TCGGGTCGAG 1560
GACTACAGTC ATTTTGCAGG TTTCCTTACT GSTATGGCTTT TAAAACGTGC AAAGGTGACC 1620
ATTAACCGTT TCACGCTGGG AGGGCACGTG CGGCTCAGAT GCTTCCTCTG ACTGAGGGCC 1680
AGGAGGGGGC TACACGGAAG AGGCCACACC CGCACTTGGG AAGACTCGAT TTGGGCTTCA 1740
GCTGGCTGAG ACGCCCCAGC AGGCTCCTCG GCTACACCTT CAGCCCCGAA TGCCTTCCGG 1800
CCCATAACCC TTCCCTTCTA GGCATTTCCG GCGAGGACCC ACCCTCGCGC CAAACATTCTG 1860
GCCCCATCCC CCGGTCCTCA CCTGAATCTC TAACTCTGGA CTCCAGAGTT TAGAGACTAT 1920
AACCAGATAG CCCGGATGTG TGGAAGTCA TCTTGGGACG AGTAGTTTTA GCAAAAAGAA 1980
AGCGACGAAA AACTACAATT CCCAGACAGA CTTGTGTTAC CTCTCTTCTC ATGCTAAACA 2040
AGCCCCCTTT AAAGGAAAGC CCCTCTTAGT CGCATCGACT GTGTAAGAAA GGCCTTTGAA 2100
ACATTTTAAT GTTGGGCACA CCGTTTCGAG GACCGAAATG AGAAAGAGCA TAGGGAAACG 2160
GAGCGCCCGA GCTAGTCTGG CACTGCGTTA GACAGCCGCG GTCGTTGCAG CGGGCAGGCA 2220
CTTGCGTGGA CGCCAAGGGG CGGGTCTTTC GGCCGGAAG CCCCGTTGGT CCGCGCGGCT 2280
CTTCCTTTCC GATCCGCCAT CCGTGGTGAG TGTGTGCTGC GGGCTGCCGC TCCGGCTTGG 2340
GGCTTCCCGC GTCGCTCTCA CCCTGGTCGG CGGCTCTAAT CCGTCTCTTT TCGAATGTAG 2400
GTGGAACCGC CGCCAAGATG CAGATTTTCG TGAAGACCCT TACGGGGAAA ACGATCACGC 2460
TCGAGGTACG AACCAGGTGG CGTGAGAAGC GAAGGCCTGC CAGAGGCCCT CTATGCTCGC 2520
TTAAAGCTT 2529

31

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 117 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: beides
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGGACCGAAA TGAGAAAGAG CATAGGGAAA CGGAGCGCCC GAGCTAGTCT GGCCTGCGT 60
TAGACAGCCG CGGTCGTTGC AGCGGGCAGG CACTTGCGTG GACGCCAAGG GCGGGT 117

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTGGTGTAGG ACTTCTTCTT C 21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTCGAGCGTG ATCGTTTCC 20

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, das Promotorsequenzen und/oder andere regulatorische Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens enthält.

5

2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen aus dem Ubiquitin-S27a-Gen des Hamsters abgeleitet sind.

10

3. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Promotorsequenzen und/oder anderen regulatorischen Sequenzen in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten sind.

15

4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3, wobei die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.

20

5. Nukleinsäuremolekül, das eine Promotorsequenz enthält, die aus der Sequenz gemäß Abb. 5 durch Substitution, Insertion oder Deletion von einer, zwei, drei oder mehr Basen ableitbar ist, ohne daß durch diese Substitution, Insertion oder Deletion die Promotoraktivität deutlich erniedrigt wird.

25

6. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es einen oder mehrere Enhancer enthält, der/die mit der Promotorsequenz funktionell verknüpft ist/sind.

30

7. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es regulatorische Sequenzen enthält, über die die Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz reguliert werden kann.

8. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen mit einem Gen funktionell verknüpft sind.

35

9. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen für Gewebeplasminogenaktivator, *second-generation*-Gewebeplasminogenaktivator, Interferon, Tumornekrosefaktor, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, Mangan-Superoxiddismutase, eine Immunglobulinkette, die variable Region einer Immunglobulinkette, eine humanisierte Immunglobulinkette, die variable Region einer humanisierten

Immunglobulinkette, einen single-chain-Antikörper und/oder einen Antikörper, der für variantes CD44 spezifisch ist, kodiert.

5 10. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Expressionsvektor ist.

11. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor durch Rekombination in das Genom von eukaryontischen Wirtszellen, vorzugsweise Hamsterzellen, besonders bevorzugt CHO-Zellen, integriert werden kann.

10

12. Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es eine amplifikationsfördernde Sequenz enthält.

13. Wirtszelle, in die ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 12
15 eingeführt wurde.

14. Wirtszelle, in die ein Nukleinsäuremolekül eingeführt wurde, das das Gen für ein heterologes Genprodukt in Verknüpfung mit dem Promotor des Hamster-Ub/S27a-Gens enthält.

20

15. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 in die eukaryontische Wirtszelle eingeführt wird, die Wirtszelle kultiviert und das
25 synthetisierte Genprodukt isoliert wird.

16. Verfahren zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in einer eukaryontischen Wirtszelle, vorzugsweise einer Hamsterzelle, besonders bevorzugt einer CHO-Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß das heterologe Genprodukt unter der Kontrolle von Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen des Ubiquitin-S27a-Gens exprimiert
30 wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen und/oder regulatorischen Sequenzen in der Abb. 5 enthalten sind.

35

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Promotorsequenzen in der Sequenz enthalten sind, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das heterologe Gen für Gewebeplasminogenaktivator, *second-generation*-Gewebeplasminogenaktivator, Interferon, Tumornekrosefaktor, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor, Mangan-Superoxiddismutase, eine Immunglobulinkette, die variable Region einer Immunglobulinkette, eine humanisierte Immunglobulinkette, die variable Region einer humanisierten Immunglobulinkette, einen single-chain-Antikörper und/oder einen Antikörper, der für variantes CD44 spezifisch ist, kodiert.
20. Starker homologer Promotor des Hamsters.
21. Promotor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Transkriptionsaktivität aufweist, die größer ist als diejenige des Thymidinkinasepromotors aus *Herpes simplex*.
22. Promotor nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Transkriptionsaktivität aufweist, die mindestens in der gleichen Größenordnung liegt wie diejenige des SV40-Promotors.
23. Promotor nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eines der Merkmale: GC-reicher Sequenzbereich, Sp1-Bindungsstelle, Polypyrimidinelement, Abwesenheit einer CAAT-Box, Abwesenheit einer TATA-Box aufweist.
24. Promotor nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Sp1-Bindungsstelle, aber keine TATA-Box aufweist.
25. Promotor nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß der in der Sequenz gemäß Abb. 5 enthalten ist.
26. Promotor nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß er in der Sequenz enthalten ist, die den Positionen -161 bis -45 gemäß Abb. 5 entspricht.
27. Verfahren zur Expression eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß das Genprodukt unter der Kontrolle eines Promotors gemäß einem der Ansprüche 21 bis 26 exprimiert wird.
28. Verwendung eines Promotors nach einem der vorangegangenen Ansprüche zur Herstellung eines heterologen Genprodukts in Hamsterzellen, vorzugsweise CHO-Zellen.

29. Ub/S27a-Gen aus Hamster.

30. Ub/S27a-Gen nach Anspruch 29 mit der Sequenz gemäß Abb. 1 oder einer Sequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einem Nukleinsäuremolekül mit der Sequenz gemäß Abb. 1 hybridisiert.

1/14

Mensch	TGGAGCCGCAACCAAAATGCAGATTTTCGTGAAAACCCCTTACGGGGAAGACCATCACCCCT *****	82
CHO	TGGAACCGCCGCCAAGATGCAGATTTTCGTGAAGACCCCTTACGGGGAACGATCACGCT :::	60
Mensch	CGAGGTTGAACCCCTCGGATACGATAGAAAATGTAAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGG *****	142
CHO	CGAGGTTGAACCCCTCGGACACTATAGAAAATGTAAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGG ▲	120
Mensch	AATTCCTCCTGATCAGCAGAGACTGATCTTTGCTGGCAAGCAGCTAGAAGATGGACGTAC *****	202
CHO	AATTCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGTAAGCAACTGGAAGATGGCCGTAC	180
Mensch	TTTGTCTGACTACAATATTCAAAGGAGTCTACTCTTCATCTTGTGTTGAGACTTCGTGG *****	262
CHO	TTTGTCTGACTACAACATCCAAAGGAGTCCACCCTTCATCTTGTGTTGAGACTTCGTGG ▲	240
Mensch	TGGTGCTAAGAAAAGGAAGAAGAAGTCTTACACCACTCCCAAGAAGAATAAGCACAAGAG *****	322
CHO	TGGTGCTAAGAAGAGGAAGAAGAAGTCTTACACCACTCCCAAGAAGAATAAGCATAAGAG	300
Mensch	AAAGAAGGTTAAGCTGGCTGTCCTGAAATATTATAAGGTGGATGAGAATGGCAAATTAG *****	382
CHO	AAAGAAGGTTAAGTTGGCTGTGCTGAAGTACTATAAGGTGGATGAAAATGGCAAATTAG ▲	360
Mensch	TCGCCTTCGTGAGAGTGCCCTTCTGATGAATGTGGTGCTGGGGTGTTTATGGCAAGTCA *****	442
CHO	TCGCCTTCGTGAGAGTGTCATCTGATGAGTGTGGTGCTGGAGTTTTCATGGCTAGCCA	420
Mensch	CTTTGACAGACATTATTGTGGCAAATGTTGTCTGACTTACTGTTTCAACAAACCAGAAGA *****	502
CHO	TTTTGACAGACATTACTGTGGCAAGTGTGTCTGACTTACTGCTTCAACAAACCAGAAGA	480
Mensch	CAAGTAA *****	509
CHO	CAAGTAGTTGTGTATGAATAAATAAAAA	508

92.2% Homologie

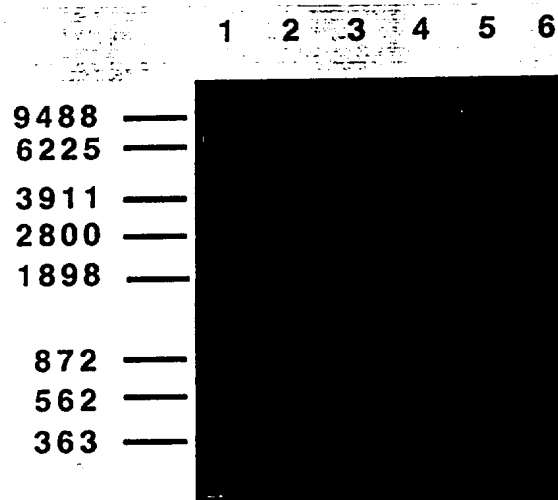
____ Poly A Signal ::: Startkodon +++ Stoppkodon

2/14

Mensch	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG *****	35
CHO	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG	35
Mensch	IPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV *****	70
CHO	IPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV	70
Mensch	LRLRGGAKKRKKKSYTTPKKNKHKRKKVKLAVLKY *****	105
CHO	LRLRGGAKKRKKKSYTTPKKNKHKRKKVKLAVLKY	105
Mensch	YKVDENGKISRLLRRECPSDECGAGVFMASHFDRHY *****	140
CHO	YKVDENGKISRLLRRECPSDECGAGVFMASHFDRHY	140
Mensch	CGKCCLTYCFNKPEDK *****	156
CHO	CGKCCLTYCFNKPEDK	156

100% Homologie

3/14

*Abb. 3*

4/14

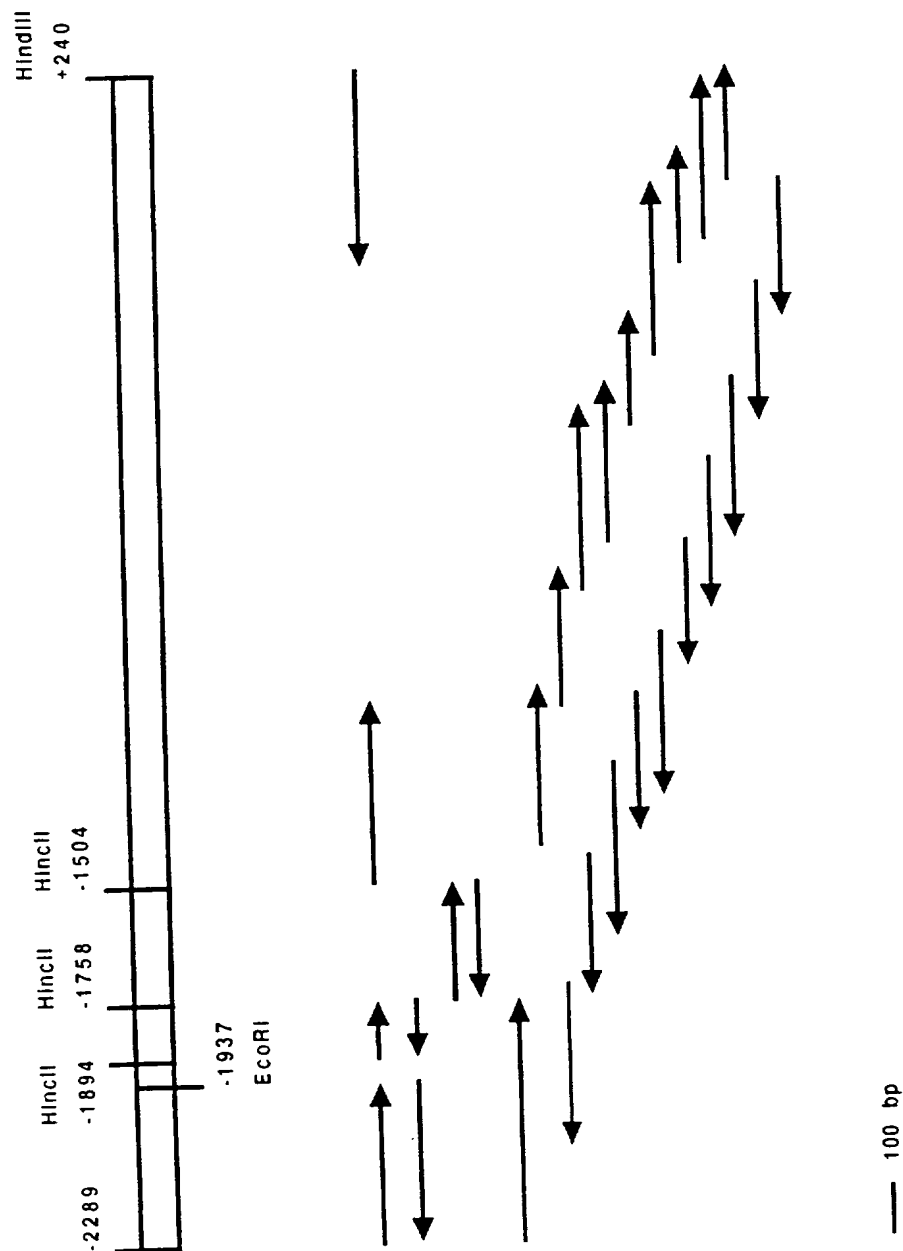


Abb. 4

5/14

GATCTCCAGGACAGCCATGGCTATTACACAGAGAAACCCTGTCTGGAAAA	- 2240
ACAAAAAATTAGTGTCCATGTGTAAATGTGTGGAGTATGCTTGTTCATGCC	- 2190
ACATACAGAGGTAGAGGGCAGTTTATGGGAGTCAGTTTCCTATTCTTCCTT	- 2140
TATGGGGGACCTGGGGACTGAACTCAGGTCATCAGGCTTGGCAGAAAGTG	- 2090
CATTAGCTCACGGAGCCTTATCATTGGCGAAAGCTCTCTCAAGTAGAAAA	- 2040
TCAATGTGTTTGCTCATAGTGCAATCATTATGTTTTCGAGAGGGGAAGGGT	- 1990
ACAATCGTTGGGGCATGTGTGGTCACATCTGAATAGCAGTAGCTCCCTAG	- 1940
<u>GAGAAATTC</u> CAAGTTCTTTGGTGGTGTATCAATGCCCTTAAAGGGGTCAAC	- 1890
EcoRI	HincII
AACTTTTTTCCCTCTGACAAAACATCTTCTTATGTCCTTGTCCCTCAT	- 1840
ATTTGAAGTATTTTATTCTTTGCAGTGTTGAATATCAATTCTAGCACCTC	- 1790
AGACATGTTAGGTAAGTACCCTACAACCTCAGGTTAACTAATTTAATTTAA	- 1740
	HincII
CTAATTTAACCCCAACACTTTTTCTTTGTTTTATCCACATTTGTGGAGTGT	- 1690
GT	- 1640
GTGTGTGTGCCGCGCGCGCTCGGATCATTTCTACCTTTTGTTTAAAAAATG	- 1590
TTAGTCCAGGGGTGGGGTGCACTGTGAAAGTCTGAGGGTAACTTGCTGGG	- 1540
	-> 1612 bp
GTCAGTTCTTTCCACTATAGGACAGA ^CTCCAGGTGTCAACTCTTTACTG	- 1490
	HincII
ACAGAACCATCCAAATAGCCCTATCTAATTTTAGTTTTTTATTTATTTAT	- 1440

TTTTTGTTTTTTCGAGACAGGGTTTCTCTGTGGCTTTGGAGGCTGTCCTGG	- 1390

AACTAGCTCTTGTAGACCAGGCTGGTCTCGAACTCAGAGATCCACCTGCC	- 1340
TCTGCCTCCTGAGTGCTGGGATTAAAGGCATGCGCCACCAACGCTTGGCT	- 1290
CTACCTAATTTTAAAAGAGATTGTGTGTCAAGGGTGTTCATGTCGCCCT	- 1240
GCAACCACCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTTCACTGAAGCTGA	- 1190
AGCACGATGATTTGGTTACTCTGGCTGGCCAATGAGCTCTAGGGAGTCTC	- 1140
CTGTCAAACAGAATCTCAACAGGCGCAGCAGTCTTTTAAAGTGGGGTT	- 1090
ACAACACAGTTTTTTGCATATCAGGCATTTTATCTAAGCTATTTCCCAGC	- 1040
CAAAAATGTGTATTTTTGGAGGCAGCAGAGCTAATAGATTAAAATGAGGGA	- 990
AGAGCCCAACACAGGTTATTAGGAAGATAAGCATCTTCTTTATATAAAACA	- 940
AAACCAAACCAAACCTGGAGGAGGTCTACCTTTAGGGATGGAAGAAAAGAC	- 890
ATTTAGAGGGTGCAATAGAAAGGGCACTGAGTTTTGTGAGGTGGAGGACTG	- 840
GGAGAGGGCGCAACCGCTTTAACTGTCCTGTTTTGCCTATTTTTTGGGGA	- 790

6/14

CAGCACATGTTCTTATTTTCCCAGGATGGGCAATCTCCACGTCCAAACT - 740

1 -> 806 bp

TGCGGTCGAGGACTACAGTCATTTTG CAGGTTTCCTTACTGTATGGCTTT - 690

TAAAACGTGCAAAGGTGACCATTAACCGTTTCACGCTGGGAGGGGCACGTG - 640

CGGCTCAGATGCTTCCTCTGACTGAGGGCCAGGAGGGGGCTACACGGAAG - 590

AGGCCACACCCGCACTTGCGAAGACTCGATTGCGGCTTCAGCTGGCTGAG - 540

ACGCCCCAGCAGGCTCCTCGGCTACACCTTCAGCCCCGAATGCCTTCCGG - 490

CCCATAACCCCTTCCCTTCTAGGCATTTCCGGCGAGGACCCACCCTCGCGC - 440

CAAACATTCGGCCCCATCCCCCGGTCTCACCTGAATCTCTAACTCTGGA - 390

| - > 483 bp

CTCCAGAGTTTAGAGACTATAACCAGATAGCCCGGATGTGTGGAAGTCA - 340

TCTTGGGACGAGTAGTTT TAGCAAAAAGAAAGCGACGAAAAACTACAATT - 290

CCCAGACAGACTTGTGTTACCTCTCTTCTCATGCTAAACAAGCCCCCTTT - 240

AAAGGAAAGCCCCTCTTAGTCGCATCGACTGTGTAAGAAAGGCGTTTGAA - 190

| - > 272 bp

ACATTTTAAATGTTGGGCACACCGTTTTCGAGGACCGAAATGAGAAAGAGCA - 140

TAGGGAAACGGAGCGCCCGAGCTAGTCTGGCACTGCGTTAGACAGCCGCG - 90

SacII

1 -> 156 bp

GTCTGTTGCAGCGGGCAGGCACTTGCCTGGACGCCAAGGGGCGGGTCTTTTC - 40

>>>>>>

+1

GGCCGGGAAGCCCCGTTGGTCCGCGCGGCTCTTTCCTTTCCGATCCGCCAT + 11

EagI

00 01 00 06 04 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00

+ 13

CCGTGGTGAGTGTGTGCTGCGGGCTGCCGCTCCGGCTTGGGGCTTCCCGC + 61

50 50

+ 85

GTCGCTCTCACCTGGTCGGCGGCTCTAATCCGTCTCTTTTCGAATGTAG + 111

00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00

•

$$\begin{array}{ccc} \bullet & \bullet & \bullet \\ \bullet & \bullet & \bullet \end{array}$$

GTGGAACCGCCGCCAAGATGCAGATTTTCGTGAAGACCCTTACGGGGAAA + 161

M O I F V K T L T G K

ACGATCACGCTCGAGgtacgaaccaggtggcgtgagaagcgaaggcctgc + 211

T I T L E

caagagccctctatgctcgcttaaaagctt + 240

HindIII

Abb. 56

7/14

1 2

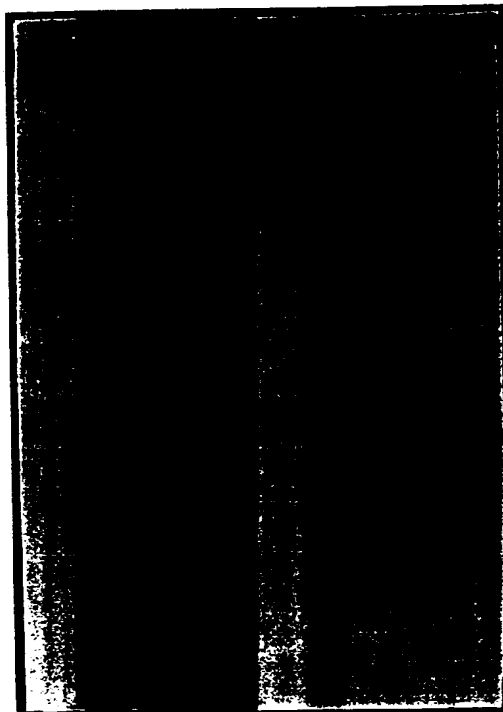


Abb. 6

8/14

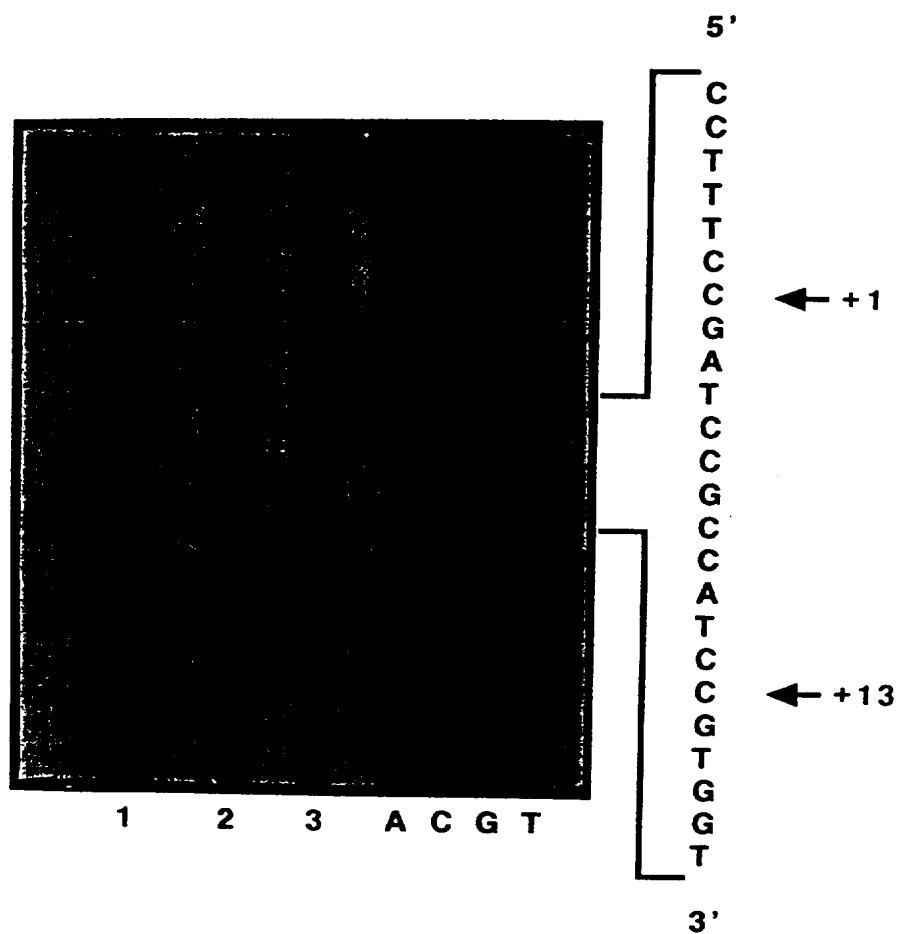


Abb. 7

9/14

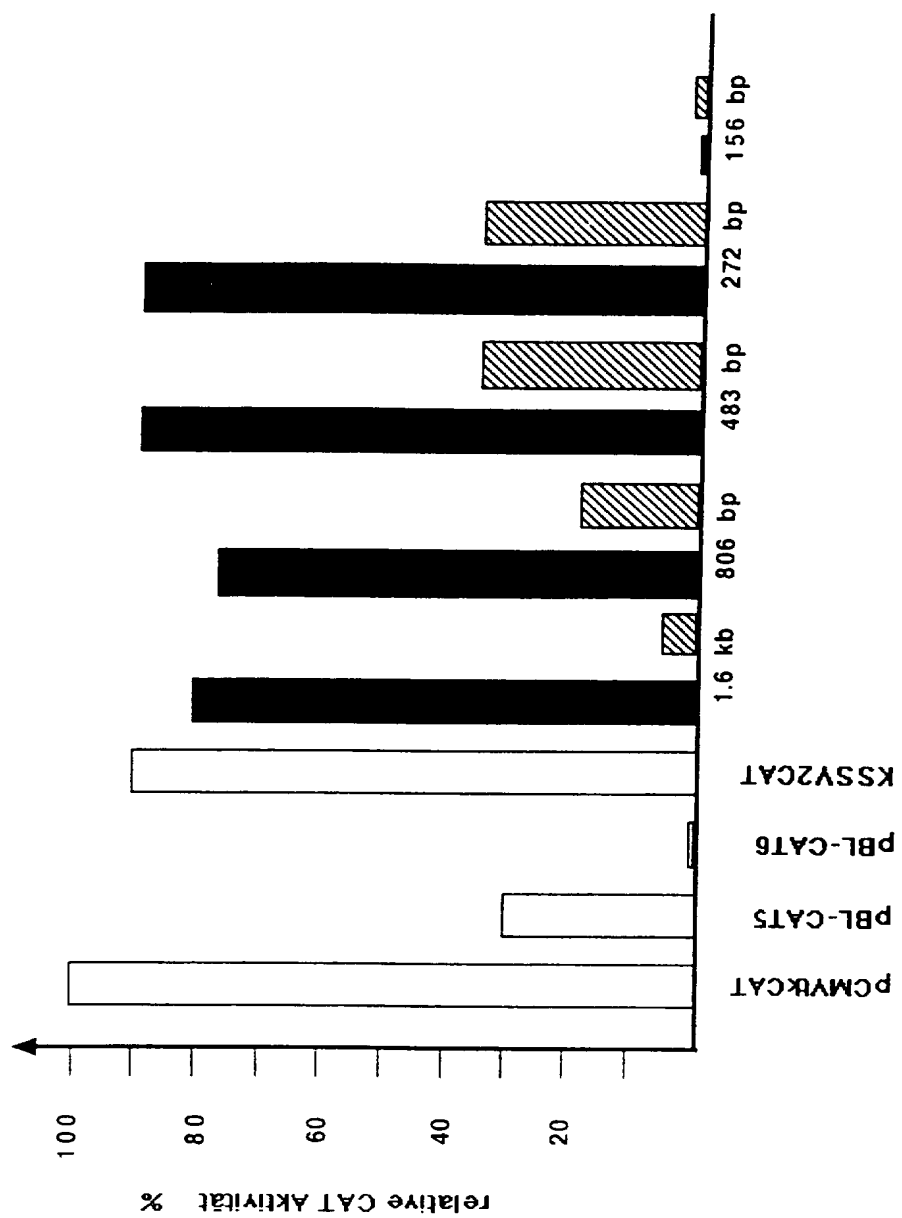


Abb. 8

10/14

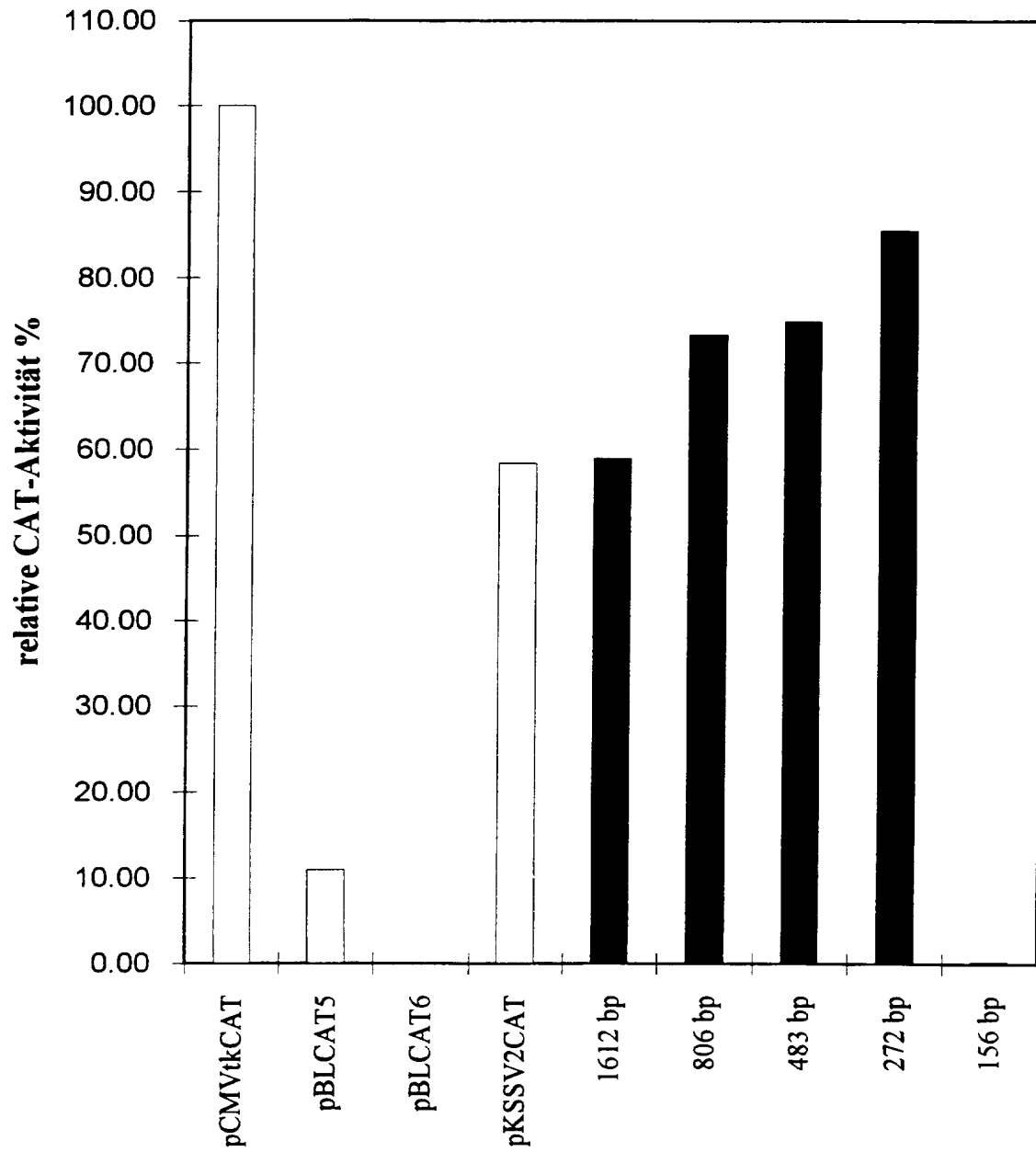


Abb. 9

11/14

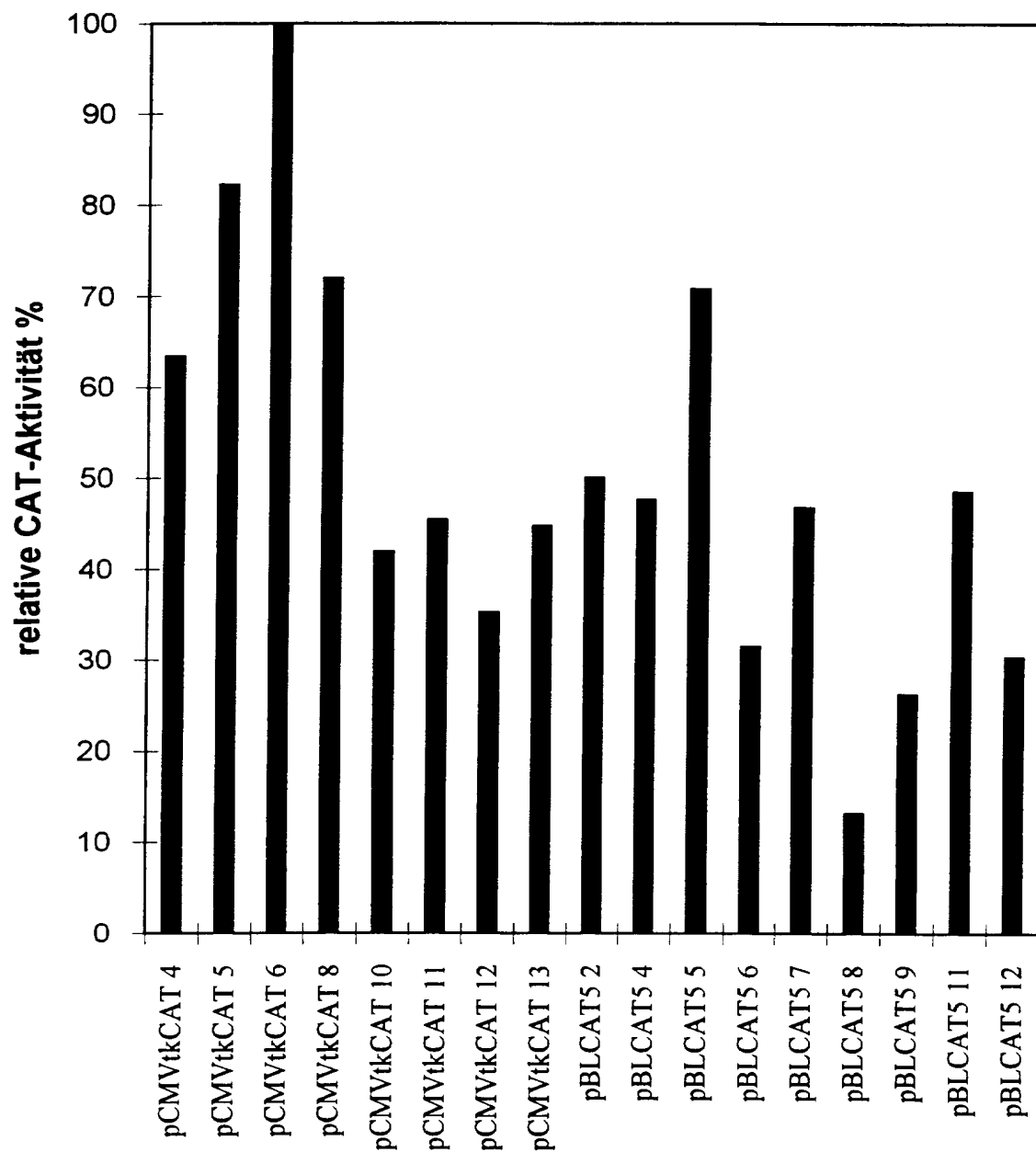


Abb. 10

12/14

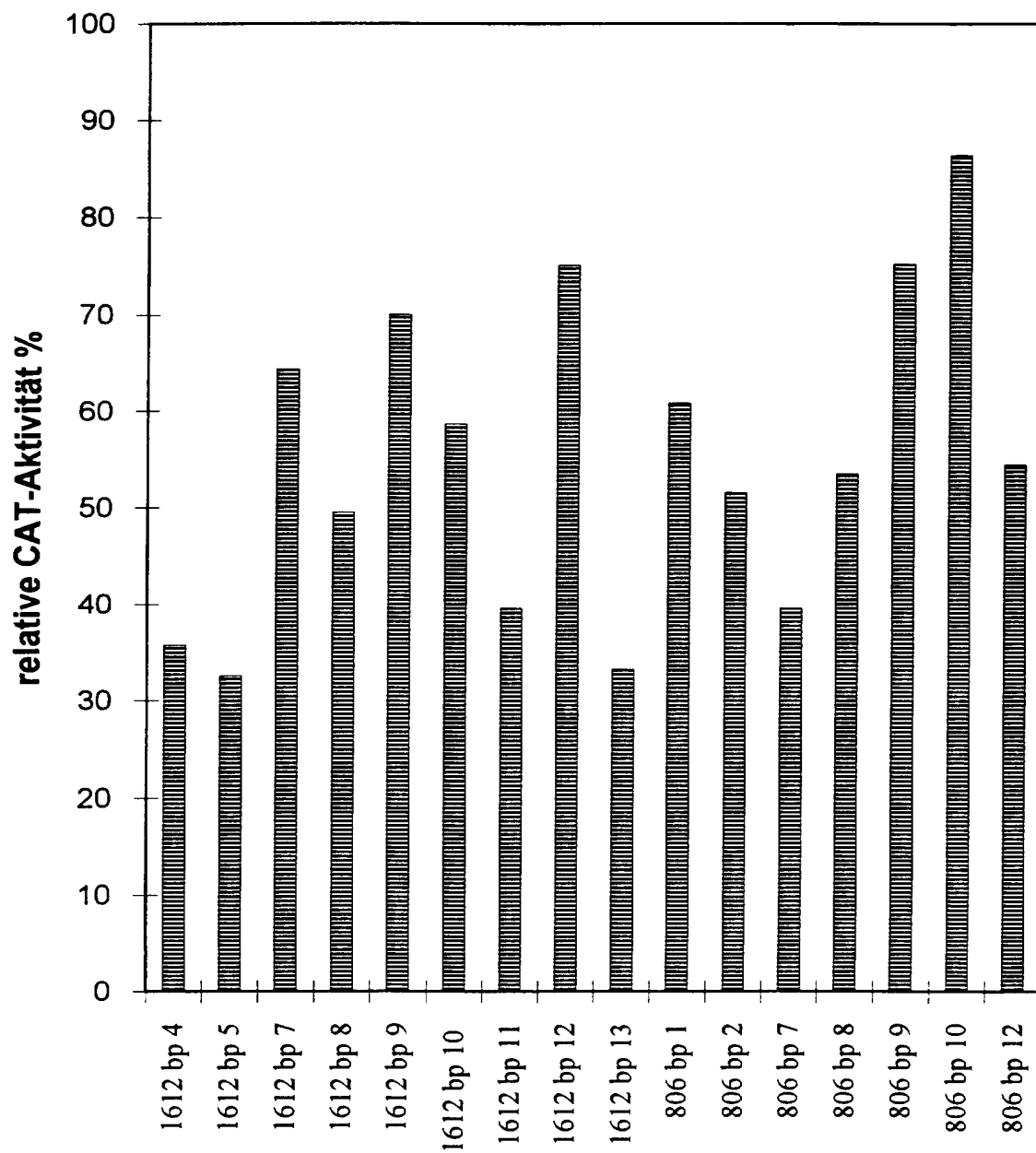


Abb. 11

13/14

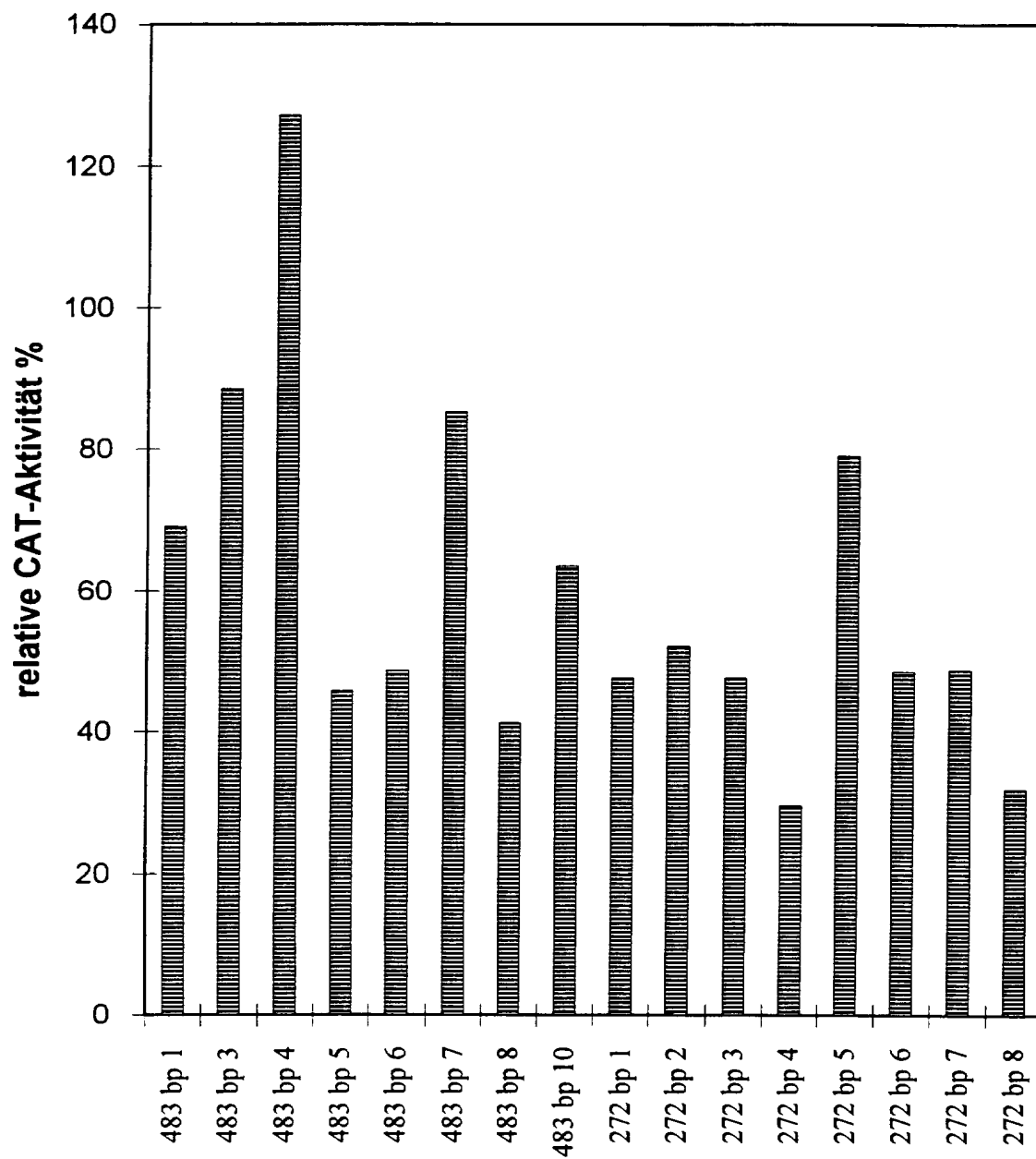


Abb. 12

14/14

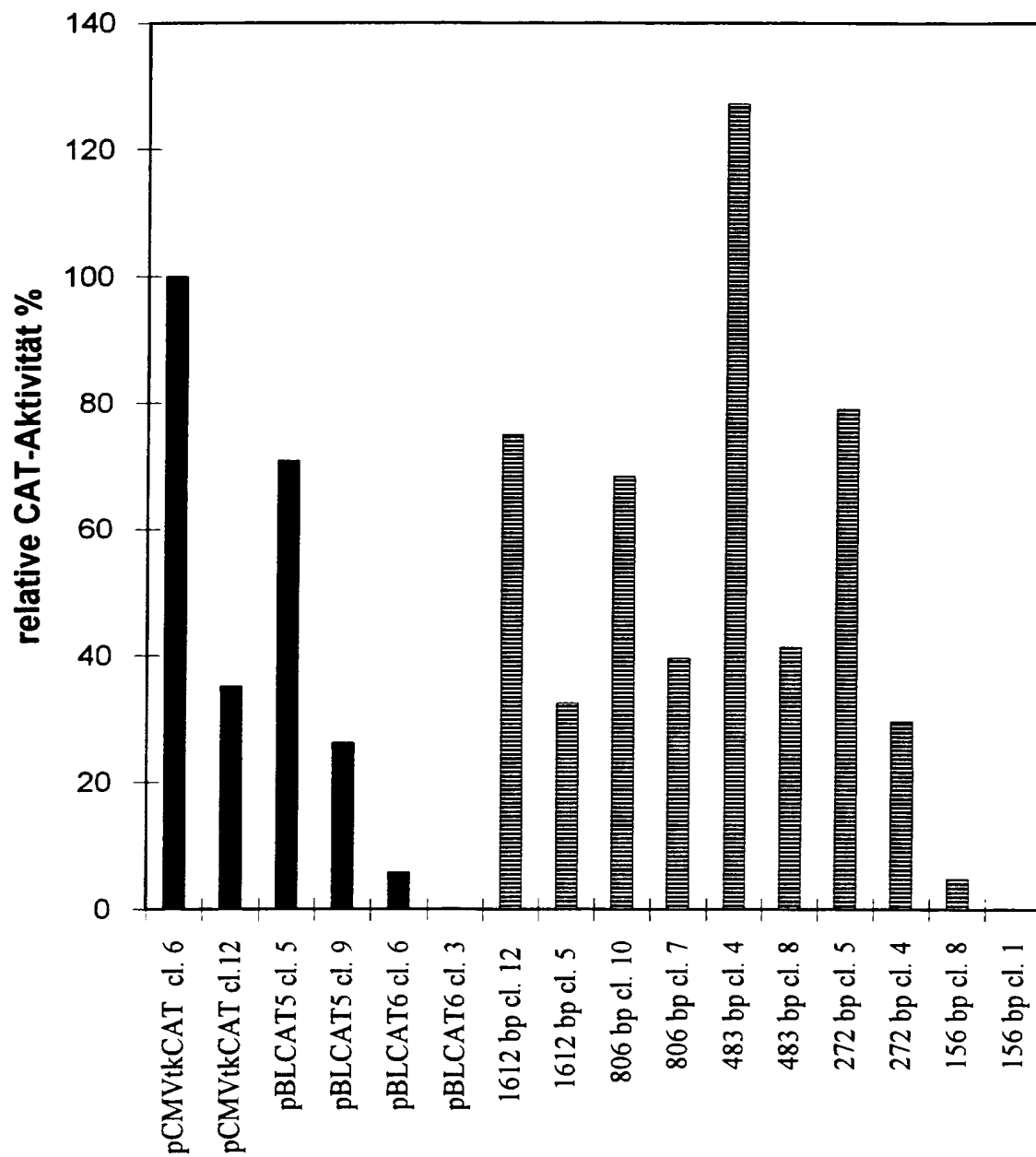


Abb. 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/04631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C12N15/85 C07K14/47 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, vol. 1204, 1994, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, pages 271-278, XP000644352 M. NENOI ET AL.: "Novel structure of a Chinese hamster polyubiquitin gene " see the whole document ---	20
X	NATURE, vol. 328, 1987, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, pages 823-827, XP002024857 A. ARTISHEVSKY ET AL.: "Cell-cycle regulatory sequences in a hamster histone promoter and their interactions with cellular factors" see the whole document --- -/--	20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 1997

Date of mailing of the international search report

26.02.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/EP 96/04631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EUR. J. BIOCHEM., vol. 220, no. 2, March 1994, SPRINGER, BERLIN, D, pages 395-402, XP000664346 H.A.R. BLUYSSSEN ET AL.: "The interferon-stimulated gene 54K promoter contains two adjacent functional interferon-stimulated response elements of different strength, which act synergistically for maximal interferon-alpha inducibility" see the whole document ---	20
A	J. BIOL. CHEM., vol. 260, no. 12, 25 June 1985, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, pages 7609-7613, XP002024621 P.K. LUND ET AL.: "Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor" see the whole document ---	1-30
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 215 (2). 1995. 682-690. ISSN: 0006-291X, 13 October 1995, XP002024622 CHAN Y-L ET AL: "The carboxyl extensions of two rat ubiquitin fusion proteins are ribosomal proteins S27a and L40." see the whole document ---	1-30
A	GENE, vol. 107, 1991, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;, pages 205-212, XP002024623 K. CHEN AND I. RUBENSTEIN: "Characterization of the structure and transcription of an ubiquitin fusion gene from maize" see the whole document ---	1-30
A	EMBO J., vol. 6, no. 5, May 1987, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, pages 1429-1439, XP002024624 E. ÖZKAYNAK ET AL.: "The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions" see the whole document ---	1-30

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 96/04631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 26, 15 September 1993, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL., INC., BALTIMORE, US, pages 19545-19551, XP002024625 D. JONES AND E.P. CANDIDO: "Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes <i>Caenorhabditis elegans</i> and <i>Caenorhabditis briggsae</i> " see the whole document ---	1-30
A	NATURE, vol. 338, 30 March 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, pages 438-440, XP002024626 K.L. REDMAN AND M. RECHSTEINER: "Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a" cited in the application see the whole document ---	1-30
A	BRITISH J. CANCER, vol. 65, 1992, MACMILLAN PRESS, LTD., LONDON UK, pages 65-71, XP000615669 S.M. ADAMS ET AL.: "Differential expression of translation-association genes in benign and malignant tumours" cited in the application see the whole document ---	1-30
A	CANCER RES 53 (8). 1993. 1916-1920. CODEN: CNREA8 ISSN: 0008-5472, 15 April 1993, XP002024627 WONG J M ET AL: "UBIQUITIN RIBOSOMAL PROTEIN S27A GENE OVEREXPRESSED IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA IS AN EARLY GROWTH RESPONSE GENE." cited in the application see the whole document ---	1-30
A	FEBS LETTERS, vol. 322, no. 3, May 1993, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, pages 235-239, XP002024628 N. SHIMBARA ET AL.: "Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells" cited in the application see the whole document ---	1-30

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 96/ 04631

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claim 28 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out, based on the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/04631

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GENE, vol. 110, 1992, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL;; pages 129-130, XP002024629 M. BOSHART ET AL.: "Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene" cited in the application see the whole document -----</p>	1-30

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PLT/EP 96/04631

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12N15/85 C07K14/47 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIOCHIMICA BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1204, 1994, ELSEVIER SCIENCE, AMSTERDAM, NL, Seiten 271-278, XP000644352 M. NENOI ET AL.: "Novel structure of a Chinese hamster polyubiquitin gene " siehe das ganze Dokument ---	20
X	NATURE, Bd. 328, 1987, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, Seiten 823-827, XP002024857 A. ARTISHEVSKY ET AL.: "Cell-cycle regulatory sequences in a hamster histone promoter and their interactions with cellular factors" siehe das ganze Dokument --- -/--	20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EUR. J. BIOCHEM., Bd. 220, Nr. 2, März 1994, SPRINGER, BERLIN, D, Seiten 395-402, XP000664346 H.A.R. BLUYSSSEN ET AL.: "The interferon-stimulated gene 54K promoter contains two adjacent functional interferon-stimulated response elements of different strength, which act synergistically for maximal interferon-alpha inducibility" siehe das ganze Dokument ---	20
A	J. BIOL. CHEM., Bd. 260, Nr. 12, 25.Juni 1985, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, Seiten 7609-7613, XP002024621 P.K. LUND ET AL.: "Nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding human ubiquitin reveals that ubiquitin is synthesized as a precursor" siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 215 (2). 1995. 682-690. ISSN: 0006-291X, 13.Oktober 1995, XP002024622 CHAN Y-L ET AL: "The carboxyl extensions of two rat ubiquitin fusion proteins are ribosomal proteins S27a and L40." siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	GENE, Bd. 107, 1991, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;, Seiten 205-212, XP002024623 K. CHEN AND I. RUBENSTEIN: "Characterization of the structure and transcription of an ubiquitin fusion gene from maize" siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	EMBO J., Bd. 6, Nr. 5, Mai 1987, OXFORD UNIVERSITY PRESS,GB;, Seiten 1429-1439, XP002024624 E. ÖZKAYNAK ET AL.: "The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions" siehe das ganze Dokument ---	1-30
	---	-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04631

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. BIOL. CHEM., Bd. 268, Nr. 26, 15.September 1993, AM. SOC. BIOCHEM. MOL.BIOL.,INC.,BALTIMORE,US, Seiten 19545-19551, XP002024625 D. JONES AND E.P. CANDIDO: "Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes Caenorhabditis elegans and Caenorhabditis briggsae" siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	NATURE, Bd. 338, 30.März 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON,UK, Seiten 438-440, XP002024626 K.L. REDMAN AND M. RECHSTEINER: "Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	BRITISH J. CANCER, Bd. 65, 1992, MACMILLAN PRESS, LTD., LONDON UK, Seiten 65-71, XP000615669 S.M. ADAMS ET AL.: "Differential expression of translation-association genes in benign and malignant tumours" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	CANCER RES 53 (8). 1993. 1916-1920. CODEN: CNREA8 ISSN: 0008-5472, 15.April 1993, XP002024627 WONG J M ET AL: "UBIQUITIN RIBOSOMAL PROTEIN S27A GENE OVEREXPRESSED IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA IS AN EARLY GROWTH RESPONSE GENE." in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30
A	FEBS LETTERS, Bd. 322, Nr. 3, Mai 1993, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Seiten 235-239, XP002024628 N. SHIMBARA ET AL.: "Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-30

-/--

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 28
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführte Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hatte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCI/EP 96/04631

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>GENE, Bd. 110, 1992, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, B.V., AMSTERDAM, NL;; Seiten 129-130, XP002024629 M. BOSCHART ET AL.: "Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----</p>	1-30